

Российская академия наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства



И.И. Мечников

Том 41
2020

3

Volume 41, Number 3, 2020

ИММУНОЛОГИЯ

Научно-практический рецензируемый журнал

Основан в 1980 г.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий,
рекомендованных Министерством науки и высшего образования Российской Федерации
для публикации результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук
Журнал индексируется в Scopus, Biological Abstracts, Chemical Abstracts,
Ulrich's International Periodicals Directory, International Nuclear Information System (INIS Atomindex),
Excerpta Medica, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science), elibrary

Главный редактор
академик РАН Хаитов Рахим Мусаевич



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Хаитов Р.М., академик РАН, доктор мед. наук, профессор

(главный редактор) (Москва, Россия)

Акдис Ч., MD, профессор (Давос, Швейцария)

Агаче И., MD, профессор (Брашов, Румыния)

Атауллаханов Р.И., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Болдырева М.Н., доктор мед. наук (Москва, Россия)

Валента Р., MD, профессор (Вена, Австрия)

Гариб Ф.Ю., доктор мед. наук, профессор (научный редактор) (Москва, Россия)

Гудима Г.О., доктор биол. наук, профессор (заместитель главного редактора)

(Москва, Россия)

Гущин И.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Джонстон С., MD, профессор (Лондон, Великобритания)

Емельянов А.В., доктор мед. наук, профессор (Санкт-Петербург, Россия)

Ильина Н.И., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Кадагидзе З.Г., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Караулов А.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Мураро А., MD, профессор (Падуа, Италия)

Пашенков М.В., доктор мед. наук (Москва, Россия)

Петров Р.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Пинегин Б.В., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Резников Ю.П., доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Сизякина Л.П., доктор мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону, Россия)

Симбирцев А.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор

(Санкт-Петербург, Россия)

Филатов А.В., доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)

Фрейдлин И.С., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор

(Санкт-Петербург, Россия)

Хаитов М.Р., член-корр. РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Шиловский И.П., доктор биол. наук (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Карамов Э.В., доктор биол. наук, профессор (Москва, Россия)

Козлов В.А., академик РАН, доктор мед. наук, профессор

(Новосибирск, Россия)

Медуницын Н.В., академик РАН, доктор мед. наук, профессор (Москва, Россия)

Николаева И.А., доктор биол. наук (Москва, Россия)

Сотникова Н.Ю., доктор мед. наук, профессор (Иваново, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Арипова Т.У., академик АН РУз, доктор мед. наук, профессор

(Ташкент, Узбекистан)

Гамбаров С.С., доктор мед. наук, профессор (Ереван, Армения)

Потапнев М.П., доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)

Титов Л.П., доктор мед. наук, профессор (Минск, Беларусь)

Научно-практический рецензируемый журнал
«Иммунология»
Том 41, № 3, 2020

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
№ 0110435 от 19.03.1993

Периодичность: 6 номеров в год.

Редакция журнала доводит до сведения читателей, что в издании соблюдаются принципы международной организации «Комитет по издательской этике» (Committee On Publication Ethics – COPE).

Никакая часть издания не может быть воспроизведена без согласия редакции. При перепечатке публикаций с согласия редакции ссылка на журнал «Иммунология» обязательна.

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Адрес редакции:
115478, г. Москва,
Каширское шоссе, д. 24

Заведующая редакцией:
Гаврикова Галина Ивановна,
editorial@immunologiya-journal.ru
(для корреспонденции)

Сайт журнала: www.immunologiya-journal.ru

Журнал распространяется по подписке.
Подписка через Интернет: www.aks.ru; www.pressa-rg.ru
Индексы по каталогу «Пресса России»:
27877 – для индивидуальных подписчиков
27878 – для предприятий и организаций

Издатель
ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа»:
115035, г. Москва,
ул. Садовническая, д. 11, стр. 12
Телефон: (495) 921-39-07
www.geotar.ru

Верстка: Килимник А.И.
Корректор: Макеева Е.И.
Выпускающий редактор: Исаева А.В.,
isaeva@geotar.ru
Отдел рекламы: Туралина О.А.,
turalina@geotar.ru

Подписано в печать 13.07.2020.

Тираж 3000 экземпляров.

Формат 60 × 90 1/8.

Печать офсетная. Печ. л. 11.

Отпечатано в АО «Первая Образцовая типография».
Филиал «Чеховский Печатный Двор».
142300, Московская область, г. Чехов,
ул. Полиграфистов, д. 1.
Заказ №

Все права защищены.

© ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа», 2020.

Russian Academy of Sciences

National Research Center –
Institute of Immunology
Federal Medical-Biological Agency of Russia

IMMUNOLOGIYA

Scientific-Practical Peer Reviewed Journal
Since 1980

Indexed in:

Scopus, Biological Abstracts,
Chemical Abstracts, Excerpta Medica,
Ulrich's International Periodicals Directory,
International Nuclear Information System
(INIS Atomindex),
Russian Science Citation Index
(no the Web of Science platform), elibrary

Editor-in-Chief

**Rakhim Khaitov, academician
of Russian Academy of Sciences**

Immunologiya

Volume 41, N 3, 2020

Mass media registration certificate
N 0110435 from 19.03.1993

Periodicity: 6 issues per year.

Journal follows the standards of publication ethics
of international organization
«Committee On Publication
Ethics» (COPE).

No part of the publication can be reproduced
without the written consent of editorial
office. Any reprint of publications
with permission of editorial office should
obligatory contain the reference
to «Immunologiya» provided the work
is properly cited.

Responsibility for authenticity
information contained in the advertisement
materials are borne by advertisers.

Address of the editorial office:
Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115478, Russia

Head of the editorial office:

Gavrikova Galina,
editorial@immunologiya-journal.ru
(for correspondence)

The website of the journal:

www.immunologiya-journal.ru

Publisher

GEOTAR-Media Publishing Group:
Sadovnicheskaya str., 11/12, Moscow, 115035, Russia
Phone: + 7 (495) 921-39-07
www.geotar.ru
Circulation of 3000 copies. Format 60 × 90 1/8.
Offset printing Scientific sh.
All rights reserved.

© GEOTAR-Media Publishing Group, 2020.

EDITORIAL BOARD

Khaitov Rakhim, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Editor-in-Chief)
(Moscow, Russia)

Akdis Cezmi, MD, PhD, prof. (Davos, Switzerland)

Agache Ioana, MD, PhD, prof. (Brasov, Romania)

Ataullakhanov Ravshan, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Boldyreva Margarita, MD, PhD (Moscow, Russia)

Emel'yanov Alexander, MD, PhD, prof. (St. Petersburg, Russia)

Filatov Alexander, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Freydlin Irina, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof.
(St. Petersburg, Russia)

Garib Firuz, MD, PhD, prof. (Scientific Editor) (Moscow, Russia)

Gudima Georgii, Dr.Sci, PhD, prof. (Deputy Editor) (Moscow, Russia)

Gushchin Igor, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Ilina Natalia, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Johnston Sebastian, MD, PhD, prof. (London, United Kingdom)

Kadagidze Zaira, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Karaulov Alexander, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Khaitov Musa, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Muraro Antonella, MD, PhD, prof. (Padova, Italy)

Pashenkov Mikhail, MD, PhD (Moscow, Russia)

Petrov Rem, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Pinegin Boris, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Reznikov Yuriy, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Simbirtsev Andrey, corresponding member of RAS, MD, PhD, prof.
(St. Petersburg, Russia)

Sizyakina Ludmila, MD, PhD, prof. (Rostov-on-Don, Russia)

Shilovskiy Igor, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

Valenta Rudolf, MD, PhD, prof. (Vienna, Austria)

EDITORIAL COUNCIL

Karamov Edward, Dr.Sci, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Kozlov Vladimir, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Novosibirsk, Russia)

Medunitsyn Nikolay, academician of RAS, MD, PhD, prof. (Moscow, Russia)

Nikolaeva Irina, Dr.Sci, PhD (Moscow, Russia)

Sotnikova Natalia, MD, PhD, prof. (Ivanovo, Russia)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Aripova Tamara, academician of AS RUz, MD, PhD, prof. (Tashkent, Uzbekistan)

Gambarov Spartak, MD, PhD, prof. (Yerevan, Armenia)

Potapnev Mikhail, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

Titov Leonid, MD, PhD, prof. (Minsk, Belarus)

Содержание

Горячие точки иммунологии

Болдырева М.Н.

Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций

Иммуногенетика

Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О.

Комбинации полиморфизмов гена фактора роста сосудистого эндотелия и генов его рецепторов (*VEGF/VEGFR*) в оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов с ревматоидным артритом

Клеточная иммунология

Терещенко В.П., Булыгин А.С., Заводский Р.Ю., Куликова Е.В., Сенников С.В.

Получение дендритных клеток мышей *in vitro* с помощью Flt3-L и их характеристика

Цитокины

Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Пашинин А.Н., Симбирцев А.С.

Оценка изменений концентраций цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra в назальных секретах больных острым гнойным риносинуситом на фоне иммунокорректирующей терапии β -D-глюканами

Иммуномодуляторы

Гурьянова С.В., Гапонов А.М., Писарев В.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Александров И.А., Цыпандина Е.В., Козлов И.Г.

Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток

Клиническая иммунология

Тихомирова А.Р., Рулева А.А.

Клинико-иммунологическая эффективность отечественного иммуностропного препарата у детей при острых респираторных инфекциях с бронхообструктивным синдромом

Методы

Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И.

Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы

Обзоры

Колесникова Н.В., Самойленко Е.С.

Роль цитокинов в патогенезе инфекционного эндокардита

Краткие сообщения

Хатамов Х.М., Суяров А.А., Киреев В.В., Зиядуллаев Ш.Х., Мухторов Ш.М., Алимжанова Л.И.

Эффективность густого экстракта суммы флавоноидов в виде мази при лечении контактного аллергического дерматита в эксперименте

Шолан Р.Ф.

Особенности иммунопатогенеза интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря

Некролог

Валентина Борисовна Гервазиева (1939–2020)

Contents

Hot points of immunology

197 **Boldyreva M.N.**

SARS-CoV-2 virus and other epidemic coronaviruses: pathogenetic and genetic factors for the development of infections

Immunogenetics

206 **Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokof'ev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O.**

Combinations of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and genes of its receptors (*VEGF/VEGFR*) at development of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis patients

Cellular immunology

215 **Tereshchenko V.P., Bulygin A.S., Zavodskii R.Yu., Kulikova E.V., Sennikov S.V.**

Generation of murine dendritic cells *in vitro* using Flt3-L and their characteristics

Cytokines

227 **Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Paschinin A.N., Simbirtsev A.S.**

Evaluation of cytokines IL-1 β and IL-1Ra concentration in nasal secretion in patients with acute purulent rhinosinusitis during immune therapy of β -D-glucans

Immunomodulators

235 **Guryanova S.V., Gaponov A.M., Pisarev V.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Alexandrov I.A., Tsipandina E.V., Kozlov I.G.**

Glucosaminylmuramyl dipeptide acid (GMDP-A) modulates intracellular signaling pathways in natural killer cells

Clinical immunology

249 **Tikhomirova A.R., Ruleva A.A.**

Clinical and immunological effectiveness of an immunotropic drug in children with acute respiratory infections with bronchial obstructive syndrome

Methods

256 **Shvedova E.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I.**

Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rh₀(D): current status of the problem

Reviews

262 **Kolesnikova N.V., Samoylenko E.S.**

The role of cytokines in the pathogenesis of infective endocarditis

Short communications

269 **Khatamov H.M., Suyarov A.A., Kireev V.V., Ziyadullaev Sh.H., Muhtorov Sh.M., Alimzhanova L.I.**

Efficiency of a dense extract of the sum of flavonoids in the form of ointment at treatment contact allergic dermatitis in experiment

274 **Sholan R.F.**

Peculiarities of immunopathogenesis of interstitial cystitis/syndrome of a pained bladder

Obituary

280 **Valentina Borisovna Gervazieva (1939–2020)**

© Болдырева М.Н., 2020

Болдырева М.Н.

Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

К концу мая 2020 г. в мире было зарегистрировано более 6,1 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из них более 370 000 – со смертельным исходом. Вспышка новой инфекции впервые произошла среди местного населения г. Ухань (Китай) в конце 2019 г. Показатель летальности происходящей в настоящее время эпидемии COVID-19 значительно ниже, чем тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) или ближневосточного респираторного синдрома (MERS), однако вирус SARS-CoV-2 распространяется гораздо быстрее, вызывая в целом гораздо больше смертей, чем SARS и MERS вместе взятые. В статье проанализирована информация, полученная в результате исследований, выполненных в период предшествующих эпидемий коронавирусных инфекций и в ходе текущей пандемии SARS-CoV-2, о факторах, которые влияют на развитие, течение и исход инфекций, вызванных коронавирусами: прямого цитопатического действия вирусов, инфекции клеток иммунной системы, роли воспаления в развитии болезни, врожденном иммунитете, аутоиммунных реакциях, особенности экспрессии иммунорегуляторных молекул, роли факторов организма хозяина, в том числе генетических.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; SARS; MERS; цитопатическое действие вируса; противовирусный иммунитет; аутоиммунитет; воспаление; цитокины; хемокины, факторы хозяина; иммуногенетика; HLA-гены; не-HLA-гены; пептидные вакцины

Статья поступила 22.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Болдырева М.Н. Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций. Иммунология. 2020; 41 (3): 197–205. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-197-205

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Boldyreva M.N.

SARS-CoV-2 virus and other epidemic coronaviruses: pathogenetic and genetic factors for the development of infections

National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

At the end of May 2020, more than 6.1 million cases of SARS-CoV-2 virus infection were registered in the world and more than 370 000 were fatal. First time outbreak of new infection occurred among residents of Wuhan, China at the end of 2019. Mortality rate for the current COVID-19 epidemic is significantly lower than for severe acute respiratory syndrome (SARS) or Middle East respiratory syndrome (MERS). However, the SARS-CoV-2 virus spreads much faster than SARS and MERS and causes far more deaths totally than both SARS and MERS combined. Information on factors that affect the development, course and outcome of infec-

Для корреспонденции
Болдырева Маргарита Николаевна –
доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник
отдела иммуногенетики
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: m.n.boldyreva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>

For correspondence
Margarita N. Boldyreva –
MD, PhD, Leader Researcher
of Immunogenetics Department,
NRC Institute of Immunology,
FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation
E-mail: m.n.boldyreva@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>

tions caused by coronaviruses stated in the article was obtained from investigations carried out during the period of previous epidemics of coronavirus infections and during the current SARS-CoV-2 pandemic. The following factors are discussed in the present article: the direct cytopathic effect of viruses, infection of the immune system cells, the role of inflammation in the development of the disease, innate immunity factors, autoimmune reactions, features of the expression of immunoregulatory molecules, the role of host organism factors, including genetic ones.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; SARS; MERS; cytopathic effect of the virus; antiviral immunity; autoimmunity; inflammation; cytokines; chemokines, host factors; immunogenetics; HLA genes; non-HLA genes; peptide vaccines

Received 22.03.2020. **Accepted** 16.04.2020.

For citation: Boldyreva M.N. SARS-CoV-2 virus and other epidemic coronaviruses: pathogenetic and genetic factors for the development of infections. *Immunologiya*. 2019; 41 (3): 197–205. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-197-205 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The author declares no conflict of interests.

Введение

По данным центра мониторинга текущей пандемии коронавирусной инфекции университета Джона Хопкинса (США), к концу мая 2020 г. в мире было зарегистрировано более 6,1 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из них более 370 000 – со смертельным исходом.

В конце 2019 – начале 2020 г. в г. Ухань (Китай) среди местного населения произошла вспышка новой инфекции. 7 января 2020 г. возбудитель заболевания, коронавирус, был зарегистрирован как новый, ему присвоили официальное название «2019-nCoV» и «SARS-CoV-2» (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), а вызываемое им заболевание получило наименование «COVID-19» («COroNaVIrus Disease 19») [1, 2]. К 22 января 2020 г. зафиксировали 314 подтвержденных случаев, 6 пациентов умерли. Таиланд, Япония и Корея 13, 16 и 21 января соответственно подтвердили обнаружение в своих странах новой инфекции, вызванной «2019-nCoV», завезенной из Китая [2, 3].

За последние годы было зарегистрировано появление двух новых коронавирусов, вызвавших две эпидемии. Коронавирус SARS-CoV, впервые обнаруженный в 2002 г. в китайской провинции Гуандун, привел к эпидемии заболевания, названного «тяжелым острым респираторным синдромом» (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS). Во время этой вспышки было подтверждено 8422 случая инфекции, из них 916 – со смертельным исходом (~10 %). В 2012 г. в Саудовской Аравии впервые был выявлен коронавирус MERS-Cov ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome, MERS). Всего в ходе эпидемии подтвердили 1401 случай инфекции MERS-Cov, из них 543 – со смертельным исходом (~39 %) [2, 4–6]. Показатель летальности для происходящей в настоящее время эпидемии, признанной пандемией COVID-19, значительно ниже, чем для SARS или MERS, однако вирус SARS-CoV-2 распространяется гораздо быстрее, вызывая в целом гораздо больше смертей, чем SARS и MERS вместе взятые.

Неожиданность появления и легкость, с которой новые коронавирусы распространяются по миру, выявляя уязвимости в области организации медицинской помощи и приводя к катастрофическим последствиям в экономике, требуют совместных усилий исследователей из разных стран по разработке способов прогнозирования тяжелого течения вирусных инфекций, созданию диагностических тестов, профилактических вакцин и лекарственных препаратов, действующих на ключевые факторы прогрессирования заболевания.

До сих пор патогенез тяжелых инфекций, вызванных коронавирусами, изучен недостаточно, однако среди исследователей есть понимание, что ключевую роль в развитии и исходе заболеваний играют как факторы, связанные с вирусом, так и факторы, связанные с иммунитетом хозяина, человека [2].

Для решения этих задач крайне актуальны исследования зависимости особенностей течения новой коронавирусной инфекции от генетики врожденного и адаптивного иммунитета хозяина в различных странах и этнических группах с целью поиска общих закономерностей, с одной стороны, и особенностей реагирования на инфекцию различных индивидуумов на различных стадиях заболеваний – с другой.

В обзоре представлена информация о факторах, которые влияют на развитие, течение и исход инфекций, вызванных коронавирусами SARS, установленных на основании исследований, выполненных в период предшествующих эпидемий и за последнее время в ходе текущей пандемии SARS-CoV-2.

Прямое цитопатическое действие вируса

Для проникновения в клетку новый коронавирус SARS-CoV-2, как и вирус SARS-CoV, использует рецептор ангиотензин-конвертирующего фермента 2 (ACE2). Это указывает на вероятность того, что новый коронавирус и SARS-CoV-2 поражают одни и те же клетки [7]: эпителиальные клетки дыхательных путей, альвеол, эндотелиальные клетки сосудов, что может вызывать серьезное повреждение легких [8, 9]. В течение первых

10 дней заболевания при активной репликации вируса его прямое повреждающее действие, по-видимому, играет ведущую роль. При недостаточности врожденного иммунитета репликация вируса может вызвать массивный апоптоз эпителиальных и эндотелиальных клеток, транссудацию жидкости через сосуды с последующим избыточным выбросом провоспалительных цитокинов и хемокинов [10]. Доказано, что вирус способен оказывать непосредственное цитопатическое действие *in vitro* как на эпителиальные клетки линии Vero E6, так и на клетки ресничного трахеобронхиального эпителия [11, 12]. Индукция апоптоза в SARS-CoV-инфицированных клетках линии Vero E6 была подтверждена морфологическим и биохимическим анализом [13]. Присутствие многоядерных клеток в легочном эпителии при SARS также может быть результатом цитопатического действия вируса [13]. В индукции апоптоза участвуют неструктурные белки SARS-CoV, обеспечивающие репликацию вируса [14–16]. Структурные белки SARS-CoV N (nucleocapsid), E (envelope), M (membrane) и S (spike) [14] также обладают способностью вызывать апоптоз *in vitro* [17]. Белки SARS-CoV могут быть вовлечены в апоптоз Т-клеток опосредованно, в результате ингибирования антиапоптотических белков Bcl-xL [18]. Сообщалось также о наличии признаков апоптоза не только в легочной ткани, но и в клетках щитовидной железы, сперматогенных эпителиальных клетках, гепатоцитах в исследованиях *in vivo* [13, 19–21].

Инфекция клеток иммунной системы

Вирусные частицы и вирусный геном SARS-CoV были обнаружены в моноцитах и лимфоцитах [22]. Для проникновения в клетки иммунной системы SARS-CoV-2 использует рецептор ACE2 [7]. В инфицированных *in vitro* мононуклеарах периферической крови вирусная репликация продолжалась вплоть до 8 дней [23]. Однако в других экспериментах SARS-CoV-инфекция макрофагов, моноцитов и дендритных клеток была abortивной [24, 25]. В мононуклеарах периферической крови, полученных от пациентов с SARS-CoV, также были обнаружены инфицирование и репликация вируса SARS-CoV, хотя репликация была самоограничивающейся [26]. Также было подтверждено инфицирование циркулирующих иммунных клеток, включая моноциты и Т-лимфоциты, уже на ранней стадии заболевания [22]. Инфекция SARS-CoV-2 может также вызывать пироптоз в макрофагах и лимфоцитах [10, 27]. Средние показатели инфицирования лимфоцитов и моноцитов у пациентов SARS составили 51,5 и 29,7 % соответственно. Кроме того, были представлены доказательства инфицирования как Т-лимфоцитов, так и макрофагов/моноцитов не только в циркулирующей крови, но также в лимфоузлах, легких и селезенке, в образцах, полученных при аутопсии погибших от SARS [22, 28, 29]. Однако прямое повреждение клеток иммунной системы может лишь частично объяснить лимфопению в периферической крови, которая была обнаружена у подавля-

ющего числа пациентов с SARS-CoV-2 (82,1 %) [30]. Подобная лимфопения может быть следствием массивной инфильтрации лимфоцитами ткани легких [27]. Инфицированные иммунные клетки могут таким образом вызывать широкое распространение вируса в различных органах и прежде всего в легких, о чем сообщалось в ряде исследований [21, 22, 28, 31].

Вирусное разрушение моноцитов и Т-клеток, участвующих как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете, может привести к нарушению иммунного ответа и в результате – к возникновению тяжелого повреждения легких [22]. Это подтверждается данными о том, что низкий уровень CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов коррелирует с тяжестью заболевания и неблагоприятным исходом [32, 33].

Лимфопения наблюдается и при других инфекционных вирусных заболеваниях, таких как корь, лихорадка Эбола, лихорадка Ласса, инфекциях, вызванных респираторным синцитиальным вирусом [34–36]. Однако при этих заболеваниях прямое повреждающее действие вируса на лимфоциты обычно считают маловероятной причиной выраженного истощения лимфоцитов. Например, при кори только небольшая часть клеток периферической крови пациента инфицирована во время острой инфекции [34], что контрастирует с высоким уровнем их инфицирования при SARS. При респираторно-синцитиальных вирусных инфекциях макрофаги/моноциты являются первичными иммунными клетками, поражаемыми вирусом [36], тогда как вирусы, вызывающие геморрагическую лихорадку, не способны инфицировать лимфоциты [36].

Воспаление. Хемокины и цитокины

Воспалительные реакции, связанные с вирусом SARS-CoV-2, по последовательности возникновения условно можно разделить на первичные и вторичные [8].

Первичные воспалительные реакции возникают сразу же после инфицирования, еще до появления нейтрализующих антител (Ат). Эти реакции обусловлены в основном активной репликацией вируса, его прямым цитопатическим действием и врожденным противовирусным иммунным ответом организма хозяина.

Уже на начальной стадии инфекции SARS-CoV-2 наблюдается увеличение концентрации различных цитокинов в плазме крови, включая интерлейкины (ИЛ)-1 β , ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, фактор роста фибробластов (ФРФ) гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), интерферон- γ (ИФН- γ), ИФН- γ -индуцируемый белок 10 (P10), моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (MCP1), макрофагальные воспалительные белки (MIP1A/CCL3, MIP1B/CCL4), фактор роста тромбоцитов (PDGF) и его рецептор (PDGFR α), фактор некроза опухоли (ФНО α) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGFB) [8].

Увеличение уровня некоторых цитокинов в сыворотке крови было обнаружено и у большинства пациентов с SARS [23, 24]. Этот уровень различался в за-

висимости от тяжести болезни. Недавние клинические исследования с участием пациентов с COVID-19 также показали зависимость уровней цитокинов и хемокинов от состояния пациентов: у пациентов с легкой формой заболевания уровень ИЛ-1 β , ИФН- γ , CXCL10/IP-10 и CCL2/MCP-1 был высоким, но еще более высоким был уровень Г-КСФ, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 и CCL3/MIP-1A у пациентов, нуждавшихся в госпитализации [27]. У пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии в критическом состоянии, были выявлены еще более высокие уровни ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-10, Г-КСФ, IP10, MCP1, MIP1A и ФНО α [22, 27]. При аутопсии пациентов с SARS были получены данные об увеличении экспрессии гена IP-10 в легочной и лимфоидной тканях, подтвержденные иммуногистохимическими исследованиями с Ат против IP-10 [26, 28], на основании которых было сделано предположение, что повышенная концентрация IP-10 является независимым предиктором неблагоприятного исхода заболевания [28].

Уровень активации синтеза хемокинов и цитокинов непосредственно в очаге поражения был исследован путем количественной оценки транскриптов генов провоспалительных цитокинов, включая CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL8, CXCL10/IP10, CCL2/MCP1, CCL3/MIP1A и CCL4/MIP1B, в образцах бронхоальвеолярного лаважа у пациентов с COVID-19. Было показано, что уровень экспрессии этих генов был значительно выше в сравнении со здоровыми донорами. Полученные данные позволили авторам сделать заключение о том, что инфицирование вирусом SARS-CoV-2 вызвало «цитокиновый шторм», который коррелировал с тяжестью заболевания [25].

При инфицировании клеток SARS-CoV виropорин 3a запускает активацию NLRP3 (NOD-подобного рецепторного белка 3) в инфламмосоме и секрецию ИЛ-1 β , что приводит к индукции клеточного пироптоза [37] и может вызвать выброс большого количества провоспалительных факторов [38]. Эксперименты *in vitro* показали, что заражение SARS-CoV макрофагов, дендритных и альвеолярных эпителиальных клеток вызывает в них гиперэкспрессию генов хемокинов, включая MIP1 α , IP-10, ИЛ-8 и MCP-1 [31–33]. Повышенная секреция этих хемокинов была подтверждена при исследовании культуральных супернатантов инфицированных клеток [31, 33]. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов и хемокинов в вирус-инфицированных клетках, экспрессирующих одновременно и белок ACE2, и SARS-CoV, у пациентов с SARS может способствовать острому повреждению тканей легких [13].

Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что SARS-CoV-инфекция эпителиальных клеток легких может индуцировать гиперсекрецию хемокинов *in vivo*. Высокие уровни хемоаттрактантов макрофагов и нейтрофилов усиливают миграцию этих иммунных клеток к месту инфекции, что подтверждается наличием инфильтратов этих клеток в тканях легкого у пациентов с COVID-19 [29]. Рекрутирование инфицированных

вирусом клеток в очаг инфекции может привести к дополнительной секреции хемокинов, еще больше усиливая миграцию некоторых типов иммунных клеток, в том числе активированных Т-клеток [31–33]. Чрезмерное высвобождение провоспалительных цитокинов и хемокинов, «цитокиновый шторм», совместно с привлечением клеток иммунной системы, часто зараженных вирусом, и нарушением обратной регуляции воспаления, возможно, могут объяснить тяжесть повреждений, наблюдаемых в легких пациентов, чувствительных к SARS-CoV [8, 34, 35].

В некоторых случаях при заболевании, наоборот, значительного повышения сывороточных уровней цитокинов, которые обычно играют важную роль в иммунной защите от вирусов, не обнаружено [26, 35]. Напротив, порой было выявлено увеличение в сыворотке крови некоторых иммуносупрессирующих растворимых факторов, таких как простагландин E2 и ТФР β , что может дать альтернативное объяснение длительного и тяжелого клинического течения SARS [36].

Вторичные воспалительные реакции могут развиваться у части пациентов, начиная с этапа формирования адаптивного иммунитета, появления нейтрализующих Ат, снижения репликации вируса, но сопровождаться значительной воспалительной реакцией.

Было высказано предположение, что серьезные нарушения воспалительной реакции при SARS в этот период могут быть связаны с чрезмерной реакцией адаптивного иммунного ответа хозяина и/или нарушенной обратной регуляцией первичной воспалительной реакции [27, 39]. Это предположение подтверждается клиническим ухудшением состояния части пациентов на второй неделе заболевания, несмотря на снижение вирусной нагрузки [34, 39, 40]. Развитие симптомов острой пневмонии совпадало с периодом сероконверсии и появления противовирусных IgG у 80 % пациентов с SARS [40]. Кроме того, пациенты, у которых быстрее вырабатывались нейтрализующие анти-S-Ат, имели большую вероятность летального исхода; умершим пациентам потребовалось в среднем всего 14,7 дня, чтобы достичь пиковых уровней активности нейтрализующих Ат, а выздоровевшим пациентам – 20 дней [41]. Противовирусные нейтрализующие Ат играют важную роль в элиминации вируса. Тем не менее исследования на животных показали, что при SARS-CoV-инфекции такие нейтрализующие Ат (анти-S-IgG) могут также вызывать тяжелое повреждение легких в результате нарушенного воспалительного ответа [42]. Есть предположение, что одним из возможных механизмов, лежащих в основе неадекватной воспалительной реакции, может быть Ат-зависимое усиление вирусной инфекции (АЗУИ) подобно тому, которое может развиваться у некоторых пациентов с недостаточной активностью Ат, которые не могут полностью элиминировать вирус, следствием чего являются репликация вируса и воспалительная реакция макрофагов. АЗУИ – хорошо известное явление, которое обнаруживалось при инфицировании человека различными вирусами, например,

вирусом лихорадки Денге, флавивирусом и вирусом гриппа [42]. Появление противовирусных Ат также может вызывать FcR-опосредованную воспалительную реакцию и тяжелое повреждение легких [8].

Врожденный иммунитет

Тот факт, что вирус постепенно размножается в верхних дыхательных путях в течение первых 10 дней после инфицирования, наводит на мысль о том, что заболевание, вызванное SARS-CoV, может являться следствием дефицита врожденного иммунного ответа [9, 32, 33, 43]. Подтверждением этого предположения могут служить данные о том, что у пациентов с тяжелым течением SARS-CoV наблюдались нарушения врожденной иммунной системы [44].

Врожденная иммунная система представляет собой первую линию обороны от вирусов и включает в себя клеточные компоненты (макрофаги и дендритные клетки) и растворимые факторы – ИФН ($-\alpha$, $-\beta$, $-\lambda$), маннозо-связывающий лектин (mannose-binding lectin, MBL) [45].

РНК-вирусы могут распознаваться несколькими рецепторами врожденного иммунитета: эндосомальными рецепторами TLR3, TLR7 и TLR8 из семейства Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR), а также цитозольными рецепторами RIG-I и MDA5 из семейства RIG-подобных рецепторов (RIG-like receptors, RLR). В соответствии с локализацией рецепторы семейства TLR распознают РНК-вирусы на стадии их входа в клетку (эндоцитоза), а RLR – на стадии репликации. Общим результатом активации этих рецепторов является индукция выработки ИФН, а также провоспалительных цитокинов [14].

Интерфероны играют решающую роль в иммунном ответе на вирусные инфекции. В течение десятилетий ИФН I типа (ИФН- α/β) изучались как медиаторы быстрой, врожденной противовирусной защиты. ИФН- α и $-\beta$ взаимодействуют с корцепторами на клеточной поверхности, которые экспрессируются на всех типах клеток. Связывание ИФН активирует сигнальный путь JAK-STAT и далее ведет к активизации большого числа генов, причем многие из них кодируют белки, опосредующие противовирусную активность. Недавно была обнаружена группа цитокинов, семейство ИФН- λ (также известное как интерфероны III типа), которые через свой отдельный рецепторный комплекс активируют тот же сигнальный путь JAK-STAT. Особенностью ИФН- λ является то, что экспрессия рецептора ИФН- λ (IFN-1R1) в значительной степени ограничивается клетками и тканями эпителиального происхождения, в том числе респираторными эпителиальными клетками [46–48]. Все чаще считают, что ИФН- λ обеспечивает иммунную защиту первой линии против вирусных инфекций дыхательных путей [49–51]. Вирусы, особенно коронавирусы, могут влиять на интерфероновый ответ, снижая его эффективность, что является важным фактором ускользания коронавирусов от противовирусного врожденного иммунитета. Распознаванию коронавирусов RLR-

рецепторами препятствует маскировка коронавирусной РНК под клеточную мРНК. Некоторые белки SARS-CoV и MERS-CoV экранируют вирусную РНК от рецептора, снижая эффективность передачи активационного сигнала в клетку [14].

Так, SARS-CoV не способен индуцировать значительную экспрессию генов ИФН- α или $-\beta$ в инфицированных макрофагах, мононуклеарных клетках периферической крови или в дендритных клетках [32, 33]. Экспериментальная инфекция штаммом MERS-CoV (HCoV-EMC) не вызывала экспрессию ИФН типов I и III в культурах респираторной ткани, в то время как штамм вируса гриппа вызывал образование высоких уровней обоих типов ИФН [52]. В другой работе ни MERS-CoV, ни SARS-CoV-инфекция не вызывали значительной экспрессии ИФН типа I в макрофагах, происходящих из моноцитов человека [53]. Совсем недавнее исследование, выполненное на модели легочной ткани человека *ex vivo*, показало, что SARS-CoV-2 практически не мог индуцировать экспрессию никаких ИФН (типа I, II или III) в инфицированных тканях легких человека [54]. Отсутствие продукции ИФН, вероятно, препятствует раннему врожденному иммунному ответу на инфекцию SARS-CoV-2 у части пациентов.

Дефицит маннозосвязывающего лектина MBL, по-видимому, также играет значительную роль в патогенезе SARS. MBL представляет собой сывороточный белок, который может связываться с лигандами различных патогенов, помечая их для иммунного разрушения, независимо от действия специфических Ат, которые выполняют аналогичную функцию [55]. MBL способен связываться с SARS-CoV и ингибировать его инфекционность *in vitro*. У пациентов с SARS были обнаружены сниженные уровни MBL в сыворотке крови и варианты гаплотипов гена *MBL*, связанные с его дефицитом [56].

Кроме того, SARS-CoV, по-видимому, способен ухудшать фагоцитарную способность макрофагов, что может сделать пациентов с SARS склонными к вторичным легочным инфекциям [57].

Аутоиммунитет

Иммунные реакции против собственных тканей также могут быть вовлечены в патогенез SARS. У инфицированных вирусом пациентов с пневмонией были обнаружены аутоантитела против клеток легочного эпителия [9, 58, 59] и эндотелия сосудов [59]. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 характерными диагностическими признаками являются подобию аутоиммунного васкулита, тромбоз и повреждение эндотелия. У многих пациентов в критическом состоянии наблюдаются васкулитоподобные проявления и даже гангрена конечностей. У пациентов с подобию аутоиммунного васкулита кровеносные сосуды альвеолярной перегородки переполнены и отечны, с умеренной инфильтрацией моноцитами и лимфоцитами внутри и вокруг сосудов. Мелкие сосуды имели признаки гиперплазии, определялись утолщение стенок сосудов, стеноз просвета, окклюзия и очаговое кровоизлияние. В части тяжелых

случаев васкулита обнаружены гиалиновые тромбы микрососудов [29, 60, 61]. У некоторых пациентов с тяжелым тромбозом были обнаружены высокие титры антифосфолипидных Ат, в том числе антикардиолипидных и анти- β 2-гликопротеиновых Ат [62]. Цитотоксическое повреждение клеток легочного эпителия и системный васкулит часто наблюдались при аутопсии умерших от SARS пациентов [58, 59].

Аутоиммунное повреждение тканей может быть частично обусловлено образованием перекрестно реагирующих Ат против специфических эпитопов SARS-CoV. Действительно, было обнаружено, что IgG-Ат против домена 2 S-белка вируса перекрестно реагируют с клетками легочного эпителия [58]. Другим механизмом, который, возможно, объясняет возникновение аутоиммунной реакции, является экспозиция клеткам иммунной системы аутоантигенов, образовавшихся в результате прямого повреждения вирусом легочного эпителия [59] и/или эндотелиальных клеток при условии генетической предрасположенности хозяина к аутоиммунным реакциям. Следствием аутоиммунного ответа может быть развитие диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдром), антифосфолипидного синдрома и подобия аутоиммунного васкулита [62].

Факторы хозяина

Целый ряд факторов хозяина, включая возраст, пол, хронические и сопутствующие заболевания, влияют на течение и исход SARS [9, 22, 63–68].

Пожилое население подвержено повышенному риску заражения и смерти от COVID-19 [63, 64], что подтверждается показателями смертности от 3 % в самой молодой возрастной группе до 55 % в самой старшей возрастной группе [64]. Выживание связано также с полом, у мужчин наблюдается значительно более высокая смертность, чем у женщин [64, 65]. Мужчины более чем в 1,5 раза чаще умирают от COVID-19 [22]. Женщины, по сравнению с мужчинами, менее восприимчивы к вирусным инфекциям из-за особенностей врожденного иммунитета, стероидных гормонов и факторов, связанных с половыми хромосомами. Женщины обычно вырабатывают более высокие уровни Ат, у них выше уровень активации иммунных клеток. С другой стороны, двухаллельная экспрессия X-сцепленных генов может вызывать патологические аутоиммунные и воспалительные реакции [69].

У пациентов с сопутствующими заболеваниями, такими как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания, болезни легких, хронический гепатит, гипертония и рак, обнаружено значительное увеличение смертности [27]. Коморбидность присутствует более чем в 30 % случаев COVID-19 [29]. Показатель летальности для пациентов с сопутствующими заболеваниями составил 46 % по сравнению с 10 % у пациентов без сопутствующих заболеваний [64]. Тот факт, что все эти сопутствующие заболевания характеризуются ухудшением сердечно-легочных функций и/или нарушением

функционирования врожденной и адаптивной иммунной системы, возможно, объясняет увеличение смертности у этих пациентов [27, 66, 67].

Иммуногенетика и пептидные вакцины

Генетические факторы, особенно имеющие отношение к иммунной системе, также, по-видимому, играют значимую роль в патогенезе SARS [70].

Вариации генов главного комплекса тканевой совместимости человека (HLA) связаны с восприимчивостью или устойчивостью к широкому кругу инфекций, включая малярию, туберкулез, лепру, ВИЧ, вирусный гепатит [71, 72]. HLA-гены были первыми генами человека, исследованными сразу после эпидемии SARS. Результаты, полученные в Тайване [73, 74], Гонконге [75], материковом Китае [76], показали наличие ассоциаций различных аллелей HLA с SARS.

В группе пациентов из Тайваня с серологически подтвержденной инфекцией SARS была выявлена выявленная связь между аллелем *HLA-B*0703* и чувствительностью к заболеванию [отношение шансов (ОШ) = 4,08; 95 % доверительный интервал (ДИ), 2,03, $p < 0,0022$] и связь между аллелем *HLA-DRB1*0301* и резистентностью к заболеванию (ОШ = 0,06; 95 % ДИ, 0,01–0,47, $p < 0,00008$) [73, 74]. Резистентность к инфекции, ассоциированная с *HLA-DRB1*0301*, была подтверждена в другом исследовании [75, 76]. В том же исследовании было показано, что с резистентностью к SARS ассоциирован также *HLA-Cw1502* [75, 76]. В другой работе распределение HLA-генов у пациентов с тяжелой SARS сравнили с таковым у медицинского персонала, работавшего с пациентами SARS, но не заболевшего. В результате было обнаружено, что *HLA-B*4601* ассоциирован с развитием тяжелой SARS [73]. Однако некоторые исследователи не смогли обнаружить никакую значимую связь между полиморфизмом HLA-генов и восприимчивостью или исходом заболевания после заражения SARS-CoV [76, 77], хотя они и не отрицают возможность такой связи. Распределение HLA-аллелей среди индивидуумов, контактировавших с инфекцией и заболевших, позволило сделать предположение, что ассоциация аллелей HLA класса II была более сильной между «Заболеванием» и «Отсутствием заболевания» после контакта с инфекцией, чем между «Инфицированием» и «Неинфицированием», что свидетельствует в поддержку участия генов HLA в развитии заболевания после инфицирования, а не в трансмиссии вируса хозяину [70].

Установлено, что у части пациентов в ответ на инфицирование вирусом развивается аутоиммунная реакция, вызывающая значительное повреждение тканей в виде ДВС-синдрома, антифосфолипидного синдрома и аутоиммунного васкулита [62]. Связь HLA-генов с аутоиммунными заболеваниями давно известна [71, 72], однако работ, исследовавших связь определенных аллелей HLA-генов с развитием варианта вирусной инфекции, при котором главную роль играет аутоиммунное поражение, пока не опубликовано.

Представление антигенов вируса молекулами HLA I и II играет критическую роль в индукции антительного и клеточно-опосредованного иммунного ответа, что необходимо учитывать при разработке вакцин против вируса 2019-nCoV и возбудителей других опасных заболеваний.

Было показано, что CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки из периферической крови пациентов с SARS отвечают на эпитопы SARS-CoV [78]. Исследования HLA класс II-рестриктурированного Т-клеточного ответа, при SARS-CoV, а также при других вирусных инфекциях, показали, что он может играть важную роль в иммунном ответе против SARS [79, 80]. Так, у здоровых индивидуумов, не контактировавших с вирусом, с HLA DR*0401 и DR*0701 были обнаружены CD4⁺-Т-клетки, специфично отвечающие на S-белок SARS-CoV. Отвечающие клетки имели фенотип CD45RA⁺ и секретировали устойчивые уровни ИФН-γ и ИЛ-13 при стимуляции антигеном [80].

В настоящее время разработка пептидных вакцин с учетом связывания вирусных пептидов с HLA-аллелями и Т-клеточными рецепторами является очень актуальным направлением. Так, с помощью математического моделирования на поверхностном гликопротеине SARS-CoV-2 были идентифицированы пять эпитопов, распознаваемых цитотоксическими Т-клетками, и пять В-клеточных эпитопов, взаимодействующих с супертипами HLA I класса, распространенными в Китае (HLA-A2, -A3, -B7, -B44 и -B62). Некоторые из этих эпитопов, как считают авторы исследования, могут быть потенциальными кандидатами для разработки вакцины против SARS-CoV-2 [81]. В другой работе авторы сообщают о том, что *in silico* было идентифицировано 63 пептида с высоким потенциалом иммуногенности и связывания с HLA-аллелями, общими для китайской и европейской популяции (HLA-A*02:01, -A*01:01, -B*07:02, -B*40:01 и -C*07:02). Эти пептиды перспективны для дальнейшей экспериментальной проверки, что может, по мнению авторов, ускорить процесс разработки вакцины против коронавируса (2019-nCoV) [82]. В результате поиска в S-, E-, M- и N-белках вируса Т-клеточных иммунодоминантных эпитопов, распознающихся HLA-DR-аллелями, общими для населения Азии (Китай, Таиланд, Япония) и Азиатско-Тихоокеанского региона, было найдено восемь эпитопов с высокой аффинностью связывания с CD4⁺-Т-клетками. Эти иммунодоминантные эпитопы, по мнению авторов, могут быть включены в универсальную субъединичную CoV-вакцину, которая может индуцировать эффективный иммунный ответ с индукцией

противовирусных Т-клеток и Ат в различных этнических популяциях [83].

Другие гены, связанные с иммунитетом, как расположенные в области HLA [9, 84, 85], так и независимые от HLA, возможно, также способны влиять на развитие инфекции. Например, гомозиготные по гену *CLEC4M*, кодирующему белок L-SIGN (liver/lymph node-specific ICAM3-grabbing non-integrin) индивидуумы, по-видимому, имеют значительно более низкий риск инфекции SARS-CoV [86]. Кроме того, определенные генотипы MBL, ассоциированные с его низким или дефицитным уровнем в сыворотке, чаще обнаруживали у пациентов с SARS, а не в группе здоровых доноров [56].

Заключение

Исходя из сообщений о патологии и патогенезе новых коронавирусных инфекций XXI века, полученных из разных стран, развитие заболеваний представляет собой сложную картину взаимодействия различных факторов. Хотя основные клинические проявления инфекций связаны с дыхательной системой, ключевую роль в патогенезе, очевидно, играет иммунная система. Гипериндукция хемокинов и цитокинов, недостаточная реакция ИФН и нарушенный клеточный иммунный ответ, вызванный прямым или косвенным повреждением иммунных клеток вирусом, аутоиммунные реакции приводят к обширным повреждениям легких у меньшей части пациентов, у значительно большего числа людей коронавирусы либо не вызывают заболевания, либо оно протекает в легкой форме.

На наших глазах впервые в истории происходят события, которые можно сравнить с глобальным биологическим экспериментом по действию новой инфекции на организм человека в зависимости от особенностей его иммунной системы. Происходящее предоставляет исследователям разных стран уникальную возможность как поиска общих закономерностей функционирования иммунной системы при ответе на новую инфекцию, так и установления различных вариантов ее реагирования в зависимости от генетики, возраста, пола, сопутствующих заболеваний, образа жизни и т. д.

Более полное понимание ключевых особенностей патогенеза, в том числе в зависимости от вариабельности генов, связанных с иммунитетом, имеет решающее значение для выработки протоколов диагностики, прогнозирования тяжелого течения инфекций, создания профилактических вакцин, разработки протоколов терапии заболеваний, вызванных новыми коронавирусами, а также другими вновь появляющимися инфекциями.

■ Литература/References

1. World Health Organization. Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus (nCoV) infection [published online ahead of print January 21, 2020]. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330374/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.1-eng.pdf>.
2. Li G., Fan Y., Lai Y., et al. Coronavirus infections and immune responses. *J. Med. Virol.* 2020; 92: 424–32.

3. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation report-2 [published online ahead of print January 21, 2020]. URL: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200122-sitrep-2-2019-ncov.pdf>.
4. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [published online ahead of print January 21, 2020]. URL: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>

5. World Health Organization. WHO MERS global summary and assessment of risk [published online ahead of print January 21, 2020]. URL: https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/risk-assessment-august-2018.pdf?ua=1.
6. Koh D., Sng J. Lessons from the past: perspectives on severe acute respiratory syndrome. *Asia Pac. J. Public Health*. 2010; 22 (3 Suppl): 132s–6s.
7. Zhao Y., Zhao Z., Wang Y. Single-Cell RNA expression profiling of ACE2, the putative receptor of Wuhan 2019-nCoV. *BioRxiv*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.01.26.919985>.
8. Fu Y., Cheng Y., Wu Y. Understanding SARS-CoV-2-mediated inflammatory responses: from mechanisms to potential therapeutic tools. *Viol. Sin.* 2020. URL: <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00207-4>.
9. Gu J., Korteweg Ch. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Pathol.* 2007; 170: 1136–47. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061088.
10. Yang M. Cell pyroptosis, a potential pathogenic mechanism of 2019-nCoV infection. *SSRN*. 2020. URL: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3527420>.
11. Drosten C., Gunther S., Preiser W., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1967–76.
12. Sims A.C., Baric R.S., Yount B., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol.* 2005; 79: 15 511–24.
13. He L., Ding Y., Zhang Q., et al. Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARSCoV-infected ACE2+ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *J. Pathol.* 2006; 210: 288–97.
14. Пашченков М.В., Хайтов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. *Иммунология*. 2020; 41 (1): 5–18. [Pashchenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya*. 2020; 41 (1): 5–18. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18. (in Russian)]
15. Yan H., Xiao G., Zhang J., et al. SARS coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* 2004; 73: 323–31.
16. Tan Y.J., Fielding B.C., Goh P.Y., et al. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* 2004; 78: 14 043–7.
17. Law P.T., Wong C.H., Au T.C., et al. The 3a protein of severe acute respiratory syndrome associated coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J. Gen. Virol.* 2005; 86: 1921–30.
18. Yang Y., Xiong Z., Zhang S., et al. Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors. *Biochem. J.* 2005; 392: 135–43.
19. Xu J., Qi L., Chi X., et al. Orchitis: a complication of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Biol. Reprod.* 2006; 74: 410–6.
20. Chau T.N., Lee K.C., Yao H., et al. SARS-associated viral hepatitis caused by a novel coronavirus: report of three cases. *Hepatology*. 2004; 39: 302–10.
21. Wei L., Sun S., Xu C.H., Zhang J., Xu Y., Zhu H., Peh S.C., Korteweg C., McNutt M.A., Gu J. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum. Pathol.* 2007; 38: 95–102.
22. Saghazadeh A., Rezaei N. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus – a perspective. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2020. DOI: 10.1080/1744666X.2020.1750954.
23. Marzi A., Gramberg T., Simmons G, DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2004; 78: 12 090–5.
24. Kuba K., Imai Y., Rao S., et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* 2005; 11: 875–9.
25. Griffith J.W., Sokol C.L., Luster A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2014; 32: 659–702. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
26. Jiang Y., Xu J., Zhou C., et al. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171: 850–7.
27. Huang C., Wang Y., Li X., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020. URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
28. Tang N.L., Chan P.K., Wong C.K., et al. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin. Chem.* 2005; 51: 2333–40.
29. Xu Z., Shi L., Wang Y., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020 Feb 18 [published online ahead of print]. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
30. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China. *MedRxiv*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.02.06.20020974>.
31. Yen Y.T., Liao F., Hsiao C.H., et al. Modeling the early events of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vitro. *J. Virol.* 2006; 80: 2684–93.
32. Law H.K., Cheung C.Y., Ng H.Y., Sia S.F., Chan Y.O., Luk W., Nicholls J.M., Peiris J.S., Lau Y.L. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood*. 2005; 106: 2366–74.
33. Cheung C.Y., Poon L.L., Ng I.H., Luk W., Sia S.F., Wu M.H., Chan K.H., Yuen K.Y., Gordon S., Guan Y., Peiris J.S. Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J. Virol.* 2005; 79: 7819–26.
34. Xiong Y., Liu Y., Cao L., Wang D., et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9 (1): 761–70. DOI: 10.1080/22221751.2020.1747363.
35. Lee C.H., Chen R.F., Liu J.W., et al. Altered p38 mitogen-activated protein kinase expression in different leukocytes with increment of immunosuppressive mediators in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Immunol.* 2004; 172: 7841–7.
36. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L.C., Lely A.T., Navis G.J., Goor H.V. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus – a first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 2004; 203: 631–7.
37. Chen I.Y., Moriyama M., Chang M.F., Ichinohe T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 50. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00050.
38. Fink S.L., Cookson B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 2005; 73: 1907–16.
39. Nicholls J.M., Poon L.L., Lee K.C. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2003; 361: 1773–8.
40. Peiris J.S., Yuen K.Y., Osterhaus A.D., Stohr K. The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 2431–41.
41. Zhang L., Zhang F., Yu W., et al. Antibody responses against SARS coronavirus are correlated with disease outcome of infected individuals. *J. Med. Virol.* 2006; 78 (1): 1–8.
42. Liu L., Wei Q., Lin Q., et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight*. 2019; 4 (4): e123158. DOI: 10.1172/jci.insight.123158.
43. Chan K.H., Poon L.L., Cheng V.C., et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 294–9.
44. Totura A.L., Baric R.S. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2 (3): 264–75.
45. Jia H.P., Look D.C., Shi L., et al. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J. Virol.* 2005; 79: 14 616–21.
46. O'Brien T.R., Thomas D.L., Jackson S.S., et al. Weak induction of interferon expression by SARS-CoV-2 supports clinical trials of interferon lambda to treat early COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* 2020. URL: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa453>.
47. Kotenko S.V., Gallagher G., Baurin V.V., et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 69–77.
48. Sheppard P., Kindsvogel W., Xu W., et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 63–8.
49. Crotta S., Davidson S., Mahlakoiv T., et al. Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. *PLoS Pathogens*. 2013; 9: e1003773.

50. Galani I.E., Triantafyllia V., Elemniadou E.E., et al. Interferon-lambda mediates nonredundant front-line antiviral protection against influenza virus infection without compromising host fitness. *Immunity*. 2017; 46: 875–90.e6.
51. Klinkhammer J., Schepf D., Ye L., et al. IFN-lambda prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *eLife*. 2018; 7: e33354.
52. Chan R.W.Y., Chan M.C.W., Agnihothram S., et al. Tropism of and innate immune responses to the novel human betacoronavirus lineage C virus in human ex vivo respiratory organ cultures. *J. Virol*. 2013; 87: 6604–14.
53. Zhou J., Chu H., Li C., et al. Active replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus and aberrant induction of inflammatory cytokines and chemokines in human macrophages: implications for pathogenesis. *J. Infect. Dis*. 2013; 209: 1331–42.
54. Chu H., Chan J.F.-W., Wang Y., et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin. Infect. Dis*. 2020 Apr 9.
55. Medzhitov R., Janeway C. Jr. Innate immunity. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343: 338–44.
56. Ip W.K., Chan K.H., Law H.K., et al. Mannose-binding lectin in severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Infect. Dis*. 2005; 191: 1697–704.
57. Tseng C.T., Perrone L.A., Zhu H., et al. Severe acute respiratory syndrome and the innate immune responses: modulation of effector cell function without productive infection. *J. Immunol*. 2005; 174: 7977–85.
58. Lin Y.S., Lin C.F., Fang Y.T., et al. Antibody to severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus spike protein domain 2 cross-reacts with lung epithelial cells and causes cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol*. 2005; 141: 500–8.
59. Yang Y.H., Huang Y.H., Chuang Y.H., et al. Autoantibodies against human epithelial cells and endothelial cells after severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus infection. *J. Med. Virol*. 2005; 77: 1–7.
60. Qin C., Zhou L., Hu Z., et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis*. 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
61. Yao X.H., Li T.Y., He Z.C., et al. A pathological report of three COVID-19 cases by minimally invasive autopsies. *Chin. J. Pathol*. 2020; 49: E009. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193.
62. Zhang W., Zhao Y., Zhang F., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The experience of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.
63. Donnelly C.A., Chani A.C., Leung G.M., et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet*. 2003; 361: 1761–6.
64. Leung G.M., Hedley A.J., Ho L.M., et al. The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients. *Ann. Intern. Med*. 2004; 141: 662–73.
65. Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A., et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*. 2003; 289: 2801–9.
66. Zou Z., Yang Y., Chen J., et al. Prognostic factors for severe acute respiratory syndrome: a clinical analysis of 165 cases. *Clin. Infect. Dis*. 2004; 38: 483–9.
67. Chan J.W., Ng C.K., Chan Y.H., et al. Short term outcome and risk factors for adverse clinical outcomes in adults with severe acute respiratory syndrome (SARS). *Thorax*. 2003; 58: 686–9.
68. Peiris J.S., Chu C.M., Cheng V.C., et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*. 2003; 361: 1767–72.
69. Conti P., Younes A. Coronavirus COV-19/SARS-CoV-2 affects women less than men: clinical response to viral infection. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2020; 34 (2). DOI: 10.23812/Editorial-Conti-3.
70. Keicho N., Itoyama S., Kashiwase K., et al. Association of human leukocyte antigen class II alleles with severe acute respiratory syndrome in the Vietnamese population. *Hum. Immunol*. 2009; 70: 527–531.
71. Hill AV. The immunogenetics of human in factious diseases. *Annu. Rev. Immunol*. 1998; 16: 593–617.
72. Martin M.P., Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr. Opin. Immunol*. 2005; 17: 510–6.
73. Lin M., Tseng H.K., Trejaut J.A., Lee H.L., Loo J.H., Chu C.C., et al. Association of HLA class I with severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *BMC Med. Genet*. 2003; 4: 9.
74. Chen Y.M., Liang S.Y., Shih Y.P., Chen C.Y., Lee Y.M., Chang L., et al. Epidemiological and genetic correlates of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the hospital with the highest nosocomial infection rate in Taiwan in 2003. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44: 359–65.
75. Ng M.H., Lau K.M., Li L., et al. Association of human leukocyte-antigen class I (B*0703) and class II (DRB1*0301) genotypes with susceptibility and resistance to the development of severe acute respiratory syndrome. *J. Infect. Dis*. 2004; 190: 515–8.
76. Xiong P., Zeng X., Song M.S., et al. Lack of association between HLA-A,-Band-DRB1 alleles and the development of SARS: A cohort of 95 SARS-recovered individuals in a population of Guangdong, southern China. *Int. J. Immunogenet*. 2008; 35: 69–74.
77. Wang S.F., Chen K.H., Chen M., et al. Human-leukocyte antigen class I Cw 1502 and class II DR 0301 genotypes are associated with resistance to severe acute respiratory syndrome (SARS) infection. *Viral Immunol*. 2011; 24 (5): 421–6. DOI: 10.1089/vim.2011.0024.
78. Li C.K., Wu H., Yan H., et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol*. 2008; 181: 5490–500.
79. Libraty D.H., O'Neil K.M., Baker L.M., et al. Human CD4(+) memory T-lymphocyte responses to SARS coronavirus infection. *Virology*. 2007; 368: 317–21.
80. Yang J., James E., Roti M., et al. Searching immunodominant epitopes prior to epidemic: HLA class II-restricted SARS-CoV spike protein epitopes in unexposed individuals. *Int. Immunol*. 2009; 21 (1): 63–71. DOI: 10.1093/intimm/dxn124.
81. Baruah V., Bose S. Immunoinformatics - aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV. *J. Med. Virol*. 2020; 92: 495–500.
82. Hyun-Jung, Lee C, Koohy H. In silico identification of vaccine targets for 2019-nCoV [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*. 2020; 9: 145. URL: <https://doi.org/10.12688/f1000research.22507.1>.
83. Ramaiah A., Arumugaswami V. Insights into cross-species evolution of novel human coronavirus 2019-nCoV and defining immune determinants for vaccine development. *BioRxiv*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1101/2020.01.29.925867>.
84. Lau Y.L., Peiris J.S. Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Immunol*. 2005; 17: 404–10.
85. Chen J., Subbarao K. The immunobiology of SARS. *Annu. Rev. Immunol*. 2007; 25: 443–72.
86. Chan V.S., Chan K.Y., Chen Y., et al. Homozygous L-SIGN (CLEC4M) plays a protective role in SARS coronavirus infection. *Nat. Genet*. 2006; 38: 38–46.

© Коллектив авторов, 2020

Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Королев М.А.,
Омельченко В.О.

Комбинации полиморфизмов гена фактора роста сосудистого эндотелия и генов его рецепторов (*VEGF/VEGFR*) в оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов с ревматоидным артритом

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», 630060, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

Введение. Риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с ревматоидным артритом (РА) значительно повышен. Основные факторы развития сердечно-сосудистого риска (ССР) данный феномен полностью объяснить не могут, поэтому анализируются и особенности системных воспалительных процессов, характерных для РА. Один из важных факторов иммунопатогенеза РА – нарушение синовиального ангиогенеза, которому могут способствовать особенности ангиогенной передачи сигналов, в том числе между фактором роста эндотелия сосудов VEGF и системой его рецепторов VEGFR.

Цель исследования – анализ однонуклеотидных полиморфизмов гена *VEGF* (rs699947, rs3025039), его рецепторов – *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP-2* (rs849530, rs849563, rs16837641) – и их комбинированной ассоциированности с повышенным ССР у пациентов с РА.

Материал и методы. Обследованы 135 пациентов с РА (медиана возраста – 55 лет, длительности заболевания – 7 лет). Увеличение ССР выявлено у 45,2 % пациентов. Генотипирование осуществляли с использованием методов рестриктивного анализа продуктов амплификации и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием TaqMan-зондов.

Результаты. Выявлены комплексные генотипы, частота которых повышена в группе пациентов с увеличением ССР относительно пациентов с РА с низким ССР. Наибольшая вероятность формирования высокого ССР выявлена у носителей комплекса *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC*, а раннего проявления высокого ССР – у пациентов с генетическим комплексом *KDR 17693CC:KDR 14011TC:NRP2 13581TT:VEGF-2578CA: VEGF+936CC*. Выявлены и протективные генотипы у пациентов, которые обладают низким ССР даже при длительном течении РА.

Заключение. Полиморфные позиции генов медиаторов ангиогенеза синергично могут быть ассоциированы с определенным ССР у пациентов с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; сердечно-сосудистые риски; полиморфизм гена *VEGF*; гены *VEGFR*; полиморфизм *KDR*; полиморфизм *NRP2*

Статья поступила 24.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О. Комбинации полиморфизмов гена фактора роста сосудистого эндотелия и генов его рецепторов (*VEGF/VEGFR*) в оценке сердечно-сосудистого риска у пациентов с ревматоидным артритом. Иммунология. 2020; 41 (3): 206–214. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-206-214

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Иммунология ■ Том 41 ■ № 3 ■ 2020

Для корреспонденции
Шевченко Алла Владимировна –
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории
клинической иммуногенетики
ИЦиГ СО РАН,
Новосибирск, Российская Федерация
E-mail: shalla64@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-5898-950X>

Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokof'ev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O.

Combinations of polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and genes of its receptors (*VEGF/VEGFR*) at development of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis patients

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630060, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Introduction. Cardiovascular risk (CR) development in rheumatoid arthritis patients (RA) is considerably increased. Major factors of CR cannot explain the given phenomenon completely, therefore features of system inflammatory processes which it is characteristic for RA are analyzed. The considered of synovium angiogenesis and of angiogenic signaling pathways, including mediated by vascular endothelial growth factor VEGF and its receptors system VEGFR is one of the important factors of RA immunopathogenesis.

Aim. Analysis of single-nucleotide polymorphisms of *VEGF* (rs699947, rs3025039), its receptors *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP-2* (rs849530, rs849563, rs16837641) genes and associations of their combinations with CR development at RA patients.

Material and methods. 135 RA patients (median age is 55 years, duration of disease is 7 years) are surveyed. The increase of CR is revealed at 45.2 % of patients. Genotyping was carried out with restriction analysis of fragment length polymorphism (RFLP) and Real-time PCR (RT-PCR) with TaqMan.

Results. The complex genotypes which frequency are increased in group of high cardiovascular risk patients concerning RA patients with low cardiovascular risk were revealed. The highest relations of chances of high CR development at carriers of complex *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC*, and early relations high CR at patients with *KDR 17693CC:KDR 14011TC:NRP2 13581TT:VEGF-2578CA: VEGF+936CC*. Protective genotypes, patients with which are steady against high CR development even at long current RA, are revealed also.

Conclusion. Polymorphic positions of angiogenesis mediators genes can in common influence change of certain CR at patients with RA.

Keywords: rheumatoid arthritis; cardiovascular risk; *VEGF* gene polymorphism; *VEGFR* genes; *KDR* polymorphism; *NRP2* polymorphism

Received 24.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokof'ev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O. Combinations of polymorphism in vascular endothelial growth factor gene and genes of its receptors (*VEGF/VEGFR*) at development of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis patients. *Immunologiya*. 2019; 41 (3): 206–14. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-206-214 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Alla V. Shevchenko –
Dr.Sci., PhD

Leading Researcher,
Laboratory

of Clinical Immunogenetics,
Research Institute of Clinical
and Experimental Lymphology –
Branch of the Institute
of Cytology and Genetics,
Siberian Branch

of Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation

E-mail: shalla64@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0001-5898-950X>

Введение

Одним из самых распространенных и прогностически неблагоприятных аутоиммунных заболеваний в мире признан ревматоидный артрит (РА) [1]. При этом установлено, что риск развития сердечно-сосудистых осложнений в этой группе пациентов значительно повышен [2]. Показано, что в течение первых 10–15 лет от начала заболевания РА сердечно-сосудистая патология регистрируется более чем у 30 % пациентов, являясь основной причиной неблагоприятных исходов [3, 4]. В метаанализе, проведенном в 2012 г. [5], включавшем дан-

ные 14 наблюдательных исследований с участием 41 490 пациентов, установлено, что наличие РА увеличивает общий риск сердечно-сосудистой патологии на 48 %, а риск инфаркта миокарда и инсульта повышается на 68 и 41 % соответственно. Наличие РА также способствует более раннему формированию хронической сердечной недостаточности [6].

В настоящее время среди исследователей нет четкого понимания особенностей механизмов, обуславливающих высокий сердечно-сосудистый риск (ССР) при РА. Традиционные факторы риска, такие как курение,

возраст, высокий индекс массы тела, уровни сахара и холестерина и др., в полной мере не объясняют развитие повышенного ССР у пациентов с патологией суставов. Поэтому анализируются и характерные для РА особенности системных воспалительных процессов [7, 8].

Одним из важных факторов иммунопатогенеза РА может считаться нарушение синовиального ангиогенеза, влияющего на степень васкуляризации синовиальной оболочки и внеклеточного матрикса. При этом важно, что эндотелиальная дисфункция, наблюдающаяся при патологическом ангиогенезе у пациентов с РА, играет значимую роль и при развитии сердечно-сосудистых нарушений [9, 10]. Одним из основных медиаторов регуляции ангиогенеза, играющих ангиогенную, воспалительную и деструктивную роль как при РА, так и при развитии сердечно-сосудистой патологии, признан фактор роста эндотелия сосудов (VEGF – Vascular endothelial growth factor) [10, 11]. Двойственная активность VEGF как стимулятора пролиферации, дифференцировки и функциональной активности эндотелиальных клеток и модулятора изменений проницаемости сосудов оказывает свое воздействие на отдельные звенья патогенеза РА. Уровни VEGF заметно выше в сыворотке и в синовиальной жидкости пациентов с РА, чем в популяционном контроле. При этом сывороточные концентрации VEGF у пациентов с РА коррелируют с уровнями С-реактивного белка, маркера воспаления и активности заболевания [12]. При кардиопатологии VEGF может действовать как на эндотелиальные клетки и быть основным регулятором миокардиального и коронарного ангиогенеза, так и оказывать цитопротективное, антиоксидантное и антиапоптотическое действие на кардиомиоциты [13]. Ряд клинических и доклинических данных свидетельствует о том, что патологическому ангиогенезу могут способствовать не только чрезмерный рост сосудов из-за неадекватного высвобождения ангиогенных факторов роста из кардиомиоцитов, тромбоцитов и воспалительных клеток, но и нарушение ангиогенной передачи сигналов, в том числе вследствие изменений структуры сигнальных молекул, ведущее к нарушению физиологического взаимодействия модуляторов ангиогенеза [13, 14]. Основные сигнальные пути опосредуются взаимодействием фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов (VEGF/VEGFR). Известны три тирозинкиназных рецептора на поверхности эндотелиальных клеток – VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3 (Flt-4) и два нетирозинкиназных трансмембранных рецептора, усиливающих активационный сигнал, но не обладающих способностью проводить его в клетку – нейропилины NRP-1 и NRP-2, причем NRP являются корецепторами VEGFR. VEGF А связывается с рецепторами VEGFR-1, VEGFR-2, а также с рецепторами NRP, но основные сосудистые и внесосудистые эффекты VEGF/VEGFR осуществляются в результате взаимодействия VEGF/VEGFR-2. Активизация VEGFR-2 ведет к увеличению пролиферации, миграции и дифференциации эндотелиальных клеток, повышению сосудистой проницаемости и мобилизации

предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга. VEGFR-2 – основной медиатор ангиогенных и митогенных функций VEGF, уровень которого регулируется гипоксией. Он же является основным индуктором VEGF-транскрипции, но при этом может модулировать сигналы и изолировать белок VEGF, действуя как негативный регулятор ангиогенеза [14]. Показано, что нейропилины NRP-1 и NRP-2, функционируя как рецепторы некоторых гепарин-связанных форм VEGF, могут играть роль в сердечно-сосудистой биологии [15, 16]. Кроме того, NRP-2 может связываться с VEGFA в тримерных комплексах с VEGFR-2-рецептором, предположительно кооперативно взаимодействуя в эндотелиальных клетках [16, 17].

VEGF кодируется геном, расположенным на хромосоме 6p21.3 и состоящим из 8 экзонов. Его рецептор VEGFR-2 кодируется геном *KDR*, расположенным на хромосоме 4q11-q12, состоящим из 30 экзонов, NRP-2 – геном на хромосоме 2q33.3, состоящим из 20 экзонов. Гены являются полиморфными, вследствие чего может меняться активность и экспрессия их белковых продуктов, сила взаимодействия белков, что по ряду исследований существенно при развитии патологий [18–21].

Информация о влиянии полиморфизма генов сигнальной цепи *VEGF/VEGFR* на развитие сердечно-сосудистой патологии при РА представлена преимущественно для азиатских популяций и достаточно неоднозначна. Кроме того, данные о совместной ассоциированности нескольких полиморфных позиций анализируемых генов представлены единично. Рассматривая потенциально значимую роль полиморфизма *VEGF*, *KDR* и *NRP-2* в развитии ССР у пациентов с РА, мы исследовали ассоциацию 7 однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs): *VEGF* (rs699947, rs3025039), *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641) генов, а также их комбинированную ассоциированность с определенным ССР у пациентов с РА.

Материал и методы

Пациенты. В исследование включены 135 пациентов с РА, находившихся на лечении в ревматологическом отделении клиники НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН. Все пациенты являлись жителями Новосибирской области, длительное время проживающими на территории Сибирского федерального округа, европеоидной внешности, идентифицирующих себя и своих родителей как русских. Диагноз РА соответствовал критериям ACR/EULAR 2010 г. Медиана возраста составила 55 лет [42; 61], длительности заболевания – 7 лет [4; 14]. Преобладали пациенты женского пола с умеренной и высокой активностью заболевания и продвинутыми рентгенологическими изменениями. Большинство пациентов были позитивными по ревматоидному фактору (РФ) и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) (табл. 1).

Критерии исключения: наличие активного и латентного туберкулеза в анамнезе и на момент скрининга; вирусные гепатиты В и С в стадии умеренной и высокой

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с ревматоидным артритом

Параметр	Значение
Возраст, <i>n</i> (%)	55 [42; 61]
Пол, <i>n</i> (%)	
мужской	18 (13,3)
женский	117 (86,7)
Длительность заболевания, годы	7 [4; 14]
СОЭ, мм/ч	26 [16; 42]
С-реактивный белок, мг/л	12,5 [4,66; 32,1]
Disease Activity Score по СОЭ (DAS28-СОЭ)	4,9 [3,7; 5,9]
Позитивность по РФ, <i>n</i> (%)	125 (92,6)
Позитивность по АЦЦП, <i>n</i> (%)	125 (92,6)
Встречаемость внесуставных проявлений, <i>n</i> (%)	60 (44,4)
Встречаемость ревматоидных узелков, <i>n</i> (%)	36 (26,7)
Рентген-стадия, <i>n</i> (%)	
I	8 (5,9)
II	51 (37,8)
III	46 (34,1)
IV	30 (22,2)
Встречаемость атеросклеротической бляшки, <i>n</i> (%)	32 (23,7)
Увеличение сердечно-сосудистого риска, <i>n</i> (%)	61 (45,2)

Примечание. СОЭ – скорость оседания эритроцитов; РФ – ревматоидный фактор; АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.

степени активности; текущее онкологическое заболевание; РА как исход ювенильного хронического артрита с возрастом дебюта до 16 лет; обострение любого другого хронического заболевания помимо РА. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИКЭЛ. Пациенты подписывали добровольное информированное согласие перед включением в исследование. Всем пациентам выполнялось ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий (УЗИ БЦА) с применением триплексного сканирования: В-режим с цветовым доплеровским картированием (ЦДК) и импульсно-волновая доплерография на аппарате Vivid 7 Dimension (General Electric) с применением линейного датчика (7–12 МГц). Верификация наличия атеросклеротической бляшки (АСБ) проводилась при локальном утолщении комплекса «интима–медиа» более 1,5 мм. Увеличение сердечно-сосудистого риска регистрировалось при наличии АСБ по УЗИ БЦА и при высоком/очень высоком риске по шкале SCORE с модифицирующим коэффициентом $\times 1,5$. Увеличение сердечно-сосудистого риска выявлено у 45,2 % пациентов, а атеросклеротическое поражение БЦА – у 23,7 %.

Генотипирование. Генотипирование полиморфизма промоторного региона гена *VEGF-2578 C→A* (rs699947) осуществляли методом рестриктоного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) с использованием специфичных праймеров: прямой 5'-GGGCCTTAGGACACCATACC-3' и обратный 5'-TGCCCCAGGGAACAAAGT-3'. Полученный амплификат 267 п. н. гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *BglII* (СибЭнзим, Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5 % агарозном геле. Полученные фрагменты 208 и 60 п. н. соответствовали аллельному варианту

VEGF-2578 A. SNP-полиморфизмы генов *VEGF+936 C→T*, (rs3025039), *NRP2 13581 T→G* (rs849530), *NRP2 68279 A→C* (rs849563), *NRP2 92646 G→A* (rs16837641), *KDR 17693 C→T* (rs10020464) и *KDR 14011 T→C* (rs11133360) анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan-зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология), согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка. При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота встречаемости генотипов, отношение шансов (ОШ) с расчетом 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). Расчет величины ОШ проводили по методу Вульфа–Холдейна. Частоту встречаемости отдельных генотипов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип, к общему числу обследованных в группе по формуле:

$$f = n/N,$$

где *n* – кратность встречаемости генотипа, *N* – число обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Результаты

Проанализированы особенности однонуклеотидного полиморфизма генов регуляции ангиогенеза *VEGF*

(rs699947, rs3025039), *KDR* (rs10020464, rs11133360), *NRP2* (rs849530, rs849563, rs16837641) у пациентов с РА при наличии или отсутствии высокого ССР. Частоты генотипов анализируемых генов в группах соответствовали равновесию Харди–Вайнберга. Распределение генотипов проанализированных единичных полиморфных позиций значимо не отличалось между группами.

Учитывая возможное синергетическое влияние нескольких полиморфных позиций одного гена на изменение уровня его активности и то, что при образовании трехмерных комплексов медиаторов VEGF/VEGFR-2/NRP-2 полиморфная структура кодирующих их генов может отражаться на эффективности взаимодействий белковых продуктов, мы проанализировали частоту встречаемости комплекса полиморфных вариантов генов, выявляемых в геноме обследованных пациентов (табл. 2).

Из программно проанализированного огромного количества возможных комбинаций анализируемых полиморфных позиций выявлено три комплексных генотипа, частота которых значительно повышена в группе пациентов с наличием высоких ССР. Один из них – *NRP2 13581GT:NRP2 92646GA:NRP2 68279AA* – объединяет все исследуемые позиции тирозинкиназного рецептора *NRP-2*, еще один – три аналогичные предыдущему комплексу позиции рецептора *NRP-2* и одну из позиций тирозинкиназного рецептора *KDR*: *KDR 17693CC:NRP2 13581GT:NRP2 92646GA:NRP2 68279AA*. Наиболее высокое соотношение шансов у обследованных пациентов с высоким ССР выявлено в комплексе *KDR 14011TT:NRP2 13581TT:VEGF-2578CC* (ОШ = 9,38; $P = 0,0074$). Два выявленных нами генотипа, напротив, являются протективными в отношении риска развития сосудистых осложнений.

Учитывая, что длительность РА влияет на развитие ССР, мы предположили, что полиморфизм генетической структуры ангиогенных медиаторов может быть ассоциирован с определенными ССР в зависимости от стажа РА, и выделили группы пациентов с длитель-

ностью РА менее 15 лет при наличии высоких ССР и аналогичную группу с низким ССР (табл. 3). С повышением ССР при небольшом стаже РА оказались ассоциированы шесть сложных генетических комплексов, один из которых – *KDR 17693CC : NRP2 13581GT : NRP2 92646GA : NRP2 68279AA* – непосредственно является фактором высокого ССР у пациентов с РА. Наибольшее значение шанса формирования высокого ССР при небольшом стаже РА у пациентов с генетическим комплексом *KDR 17693CC : KDR 14011TC : NRP2 13581TT : VEGF-2578CA : VEGF+936CC* (ОШ = 8,70; $P = 0,0137$), включающим обе анализируемые позиции гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF*. Данный генотип выявлен только у пациентов с увеличением ССР с частотой более 11 %, при этом он ни разу не встретился в группе с низким ССР. Примечательно, что в состав всех комплексов входит полиморфный генотип *KDR 17693CC*, а в состав пяти комплексов – комбинация генотипов этого гена *KDR 17693CC : KDR 14011TC*.

Выявлены также протективные простые и сложные генотипы, пациенты с их наличием имеют низкий ССР даже при длительном течении РА (табл. 4). При этом данные генотипы встречаются в группе с течением РА более 15 лет с достаточно высокой частотой (18,75–31,25 %) и чрезвычайно редки у пациентов с высоким уровнем ССР при небольшом стаже РА (0–9 %).

Обсуждение

Повышение риска развития сердечно-сосудистых заболеваний является доказанным осложнением, выявляемым у пациентов с патологией суставов. Данный феномен не может быть однозначно объяснен влиянием традиционных факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому есть мнения, что это может быть проявлением системных особенностей развития РА. Показано, что многие ключевые патогенетические медиаторы РА являются и важнейшими факторами, способствующими развитию дисфункции эндотелия и прогрессированию сердечно-сосудистого поражения. Имеющиеся экспериментальные и клиничес-

Таблица 2. Особенность распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с ревматоидным артритом (РА) и наличием/отсутствием увеличения сердечно-сосудистого риска (ССР)

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА и высоким ССР (n = 61)	Пациенты с РА и низким ССР (n = 74)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
<i>Сложные генотипы, позитивно ассоциированные с высоким ССР</i>						
<i>KDR 14011:NRP2 13581:VEGF-2578</i>	TT-TT-CC	6 (9,84)	0 (0,00)	9,38	1,12–78,40	0,0074
<i>NRP2 13581:NRP2 92646:NRP2 68279</i>	GT-GA-AA	17 (27,87)	9 (12,16)	2,79	1,14–6,82	0,0281
<i>KDR 17693:NRP2 13581:NRP2 92646:NRP2 68279</i>	CC-GT-GA-AA	13 (21,31)	6 (8,22)	3,02	1,07–8,52	0,0452
<i>Сложные генотипы, негативно ассоциированные с высоким ССР</i>						
<i>NRP2 13581:NRP2 92646</i>	GT-GG	9 (14,75)	22 (29,73)	0,41	0,17–0,97	0,0427
<i>NRP2 13581:NRP2 92646:VEGF+936</i>	GT-GG-CT	1 (1,64)	10 (13,51)	0,11	0,01–0,86	0,0123

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: N – число обследованных пациентов; ОШ – отношение шансов; ОШ 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал для ОШ; P_TMF2 – значимость различий по 2-стороннему варианту точного метода Фишера.

Таблица 3. Особенности распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с ревматоидным артритом (РА) длительностью менее 15 лет в зависимости от уровня сердечно-сосудистого риска (ССР)

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА <15 лет и высоким ССР n = 44 (%)	Пациенты с РА <15 лет и низким ССР n = 58 (%)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
KDR 17693:KDR 14011: VEGF-2578	CC-TC-CA	12 (27,27)	6 (10,53)	3,19	1,09–9,34	0,0372
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 13581:VEGF+936	CC-TC-TT-CC	7 (15,91)	2 (3,51)	5,20	1,02–26,44	0,0388
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 92646:VEGF-2578	CC-TC-GA-CA	9 (20,45)	3 (5,26)	4,63	1,17–18,29	0,0285
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 68279:VEGF-2578	CC-TC-AA-CA	11 (25,00)	5 (8,77)	3,47	1,10–10,88	0,0316
KDR 17693:NRP2 13581: NRP2 92646:NRP2 68279	CC-GT-GA-AA	11 (25,00)	5 (8,77)	3,47	1,10–10,88	0,0316
KDR 17693:KDR 14011: NRP2 13581:VEGF-2578: VEGF+936	CC-TC-TT-CA-CC	5 (11,36)	0 (0,00)	8,70	1,01–75,06	0,0137

кие данные позволяют считать, что связующим звеном между эндотелиальной дисфункцией и ускорением процессов атерогенеза, наблюдаемыми при РА, являются в том числе особенности ангиогенеза и ремоделирования сосудистой стенки. Важное значение фактора роста эндотелия сосудов и системы его рецепторов, а также значимость нарушения регуляции сигнального пути *VEGF/VEGFR* показаны как при патогенезе РА, так и при развитии сердечно-сосудистых заболеваний [9, 22].

Экспрессия генов *VEGF*, *KDR* и *NRP*, а также активность соответствующих белков могут быть следствием полиморфизма кодирующих и некодирующих регионов генов. SNPs промоторного региона и 3'-некодирующего региона гена влияют на потенциальные регуляторные элементы и способствуют вариабельности продукции *VEGF* в тканях и концентрации плазматического запаса белка. SNPs, расположенные в экзонах генов *KDR* и *NRP*, определяют эффективность связывания *VEGF* с его рецепторами. Функция полиморфизма интронов на сегодняшний день не полностью ясна. Например,

в одном из исследований показано, что некорректное полиаденилирование в интронном сайте polyA (PAS), которое в норме является неотъемлемой частью процессинга мРНК и необходимо для обеспечения эффективного экспорта, трансляции и стабильности мРНК-транскриптов, приводит к образованию укороченных зрелых мРНК и изоформам белка. Эти варианты стабильны и хорошо экспрессируются, но поскольку усечение может приводить к тому, что белкам станет не хватать необходимых С-концевых доменов, функция этих изоформ часто резко отличается от их полноразмерных аналогов. Это очевидно в процессинге трансмембранных белков, таких, как рецепторные тирозинкиназы, где использование восходящей интронной PAS может генерировать растворимые изоформы, лишённые якорного трансмембранного домена и функции внутриклеточной киназы. Такие растворимые изоформы могут сохранять связывание лиганда с высокой аффинностью и действовать как доминантно-негативные регуляторы сигнального пути [23]. Кроме того, интронные SNP могут способствовать ошибкам сплайсинга, приводя к не-

Таблица 4. Особенности распределения частот генотипов генов *VEGF* и его рецепторов *KDR* и *NRP2* у пациентов с РА длительностью менее 15 лет и наличием высокого ССР против группы пациентов с длительным течением РА и низким уровнем ССР

Полиморфная позиция	Генотип	Пациенты с РА < 15 лет и высоким ССР n = 44 (%)	Пациенты с РА ≥ 15 лет и низким ССР n = 16 (%)	ОШ	ОШ 95 % ДИ	P_TMF2
NRP2 13581	GG	4 (9,09)	5 (31,25)	0,22	0,05–0,96	0,0481
KDR 17693 : NRP2 13581	CT-GG	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
KDR 14011 : NRP2 68279	CC-AC	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
NRP2 13581 : NRP2 68279	GG-AA	2 (4,55)	4 (25,00)	0,14	0,02–0,88	0,0384
NRP2 68279 : VEGF-2578	AC-AA	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
KDR 14011 : NRP2 13581 : NRP2 68279	TT-GG-AA	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164
NRP2 13581 : NRP2 68279:VEGF + 936	GG-AA-CT	0 (0,00)	3 (18,75)	0,08	0,01–0,75	0,0164

правильному удалению интрона и вызывая изменения открытой рамки считывания. Исследования последних лет подчеркнули обилие и важность сплайсинговых мутаций в этиологии наследственных и мультифакторных заболеваний [24, 25]. Ассоциированность с патологиями на сегодняшний день выявляется для различных полиморфных локусов генов [18]. В нашем исследовании мы не обнаружили разницы в частотах распределения единичных генотипов в анализируемых позициях между группами пациентов с РА с высоким и низким ССР. Только *NRP2 13581GG*-генотип являлся протективным в отношении развития сердечно-сосудистых осложнений при длительном течении РА. Результаты некоторых исследований указывают на возможную роль полиморфизмов rs699947 и rs3025039 регуляторных регионов *VEGF* в развитии сердечно-сосудистых осложнений, но преимущественно в азиатских популяциях [26, 27].

Предполагается, что *KDR* играет важную роль в развитии и формировании сетей кровеносных сосудов. Именно после связывания *VEGF* с *VEGFR-2* активизируются ранние каскады передачи сигналов в эндотелиальных клетках [28]. Обе полиморфные позиции гена *KDR*, проанализированные нами, являются интронными: *KDR* rs11133360 – в третьем, *KDR* rs10020464 – в седьмом интроне гена (по данным базы NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Значимость полиморфизма этих позиций показана для ряда заболеваний, особенностей их течения или эффективности лечения. Некоторыми авторами выявлен синергический эффект нескольких полиморфных позиций в гаплотипах или генотипах [29–31]. Показана ассоциированность с повреждениями коронарных артерий у пациентов с РА для полиморфного сайта rs11133360 гена *KDR* [32] и негативная корреляция между уровнем экспрессии гена и минорным аллелем *C* в данной полиморфной позиции [30].

Трансмембранный нетирозинкиназный гликопротеин *NRP-2* принимает участие в различных физиологических процессах, в том числе в ангиогенезе [33]. Связь с различными патологиями показана для всех анализируемых нами полиморфных позиций гена, из которых, по данным базы NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, rs16837641 и rs849530 являются интронными, а rs849563 расположен в кодирующем регионе гена *NRP2* и является синонимичной (молчащей) мутацией, при которой SNPs не приводят к изменению аминокислотной последовательности кодируемого белка,

что является результатом вырожденности кода (при замене *NRP 168279C* кодируется Pro 558) [34–36]. Хотя большинство синонимичных SNPs не изменяют функцию белков, первичная последовательность и структура мРНК влияют на аффинность мРНК-связывающих факторов и синонимичные кодоны могут влиять на формирование вторичной структуры мРНК и характер последующих комплексов [37]. На сегодняшний день нет понимания основных молекулярных механизмов, с помощью которых синонимичные SNPs могут способствовать развитию заболеваний, однако появляется все больше данных, указывающих на связь синонимичных мутаций с патологиями [38–41].

Несомненно, важными являются и мультивариантные взаимодействия между генами, проанализированные нами, поскольку сведения о геномных отношениях дают основу для большой области сетевых медицинских исследований, освещающей многофакторную природу болезней. Кроме того, при низком вкладе отдельных геномных изменений именно комплексные генетические особенности как на уровне одного гена, так и между функционально-интегрированными генами дают более полную картину их связи с патогенезом заболевания. В последние годы именно сетевые подходы предлагаются для изучения как связей между заболеваниями человека и отношениями между их эффекторными генами, так и выявлению общих генетических изменений для различных заболеваний [42–44].

Заключение

Полученные нами данные являются приоритетными в плане представления полиморфизма комплекса *VEGF/VEGFR* при РА и в оценке ССР при РА для популяций европеоидного происхождения и для пациентов русской национальности. Кроме того, обращает на себя внимание и практически десятикратное превышение частоты встречаемости комбинированного генетического признака «*KDR 14011:NRP2 13581:VEGF-2578*» в группе пациентов с РА с высоким ССР, что может быть использовано в качестве дополнительного критерия персонализированного прогноза раннего развития этого варианта течения клинически полиморфного РА. Перспективными для дальнейших исследований можно считать и полученные достоверные данные об увеличении распространения ряда комбинированных генетических признаков у пациентов с ранним увеличением ССР.

Литература

1. Hodkinson B., Tikly M., Adebajo A. Rheumatoid arthritis in the developing world: stepping up to the challenge. *Clin. Rheumatol.* 2014; 33 (9): 1195–6. DOI: 10.1007/s10067-014-2690-3.
2. Radner H., Lesperance T., Accortt N., Solomon D. Incidence and prevalence of cardiovascular risk factors among patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, or psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017; 69 (10): 1510–8. DOI: 10.1002/acr.23171.
3. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Сатыбалдыев А.М. Ревматоидный артрит в Российской Федерации по данным Российского регистра больных артритом (сообщение I). *Научно-практическая ревматология*. 2015; 5: 472–84. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-50-62.
4. Mulumba C., Lebughe P., Mbuyi-Muamba J.-M., Makulo J.-R., Lepira F., Mukaya J. et al. Prevalence and associated factors of subclinical athero-

sclerosis in rheumatoid arthritis at the university hospital of Kinshasa. *BMC Rheum.* 2019; 3: 37. DOI: 10.1186/s41927-019-0085-4.

5. Avina-Zubieta J.A., Thomas J., Sadatsafavi M., Lehman A.J., Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71 (9): 1524–9. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200726.

6. Garza-García C., Rocio S.S., Orea-Tejeda A., Castillo-Martínez L., Eduardo C., López-Campos J.L. et al. Risk factors for asymptomatic ventricular dysfunction in rheumatoid arthritis patients. *ISRN Cardiol.* 2013; 2013: 635439. DOI: 10.1155/2013/635439.

7. Jagpal A., Navarro-Millán I. Cardiovascular co-morbidity in patients with rheumatoid arthritis: a narrative review of risk factors, cardiovascular risk assessment and treatment. *BMC Rheum.* 2018; 2: 10. DOI: 10.1186/s41927-018-0014-y.

8. Skeoch S., Bruce I.N. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11 (7): 390–400. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.40.
9. Sarli B., Baktir A.O., Cebicci M., Dogan Y., Demirbas M., Kurtul S. et al. Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology.* 2014; 65 (9): 778–82. DOI: 10.1177/0003319713504485.
10. Moraga A., Lao K.H., Zeng L. *Angiogenesis and Cardiovascular Diseases: The Emerging Role of HDACs, Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy.* Dan Simionescu and Agneta Simionescu. IntechOpen. 2017. DOI: 10.5772/66409. URL: <https://www.intechopen.com/books/physiologic-and-pathologic-angiogenesis-signaling-mechanisms-and-targeted-therapy/angiogenesis-and-cardiovascular-diseases-the-emerging-role-of-hdacs>.
11. Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., Haladyj E., Malinowski D., Stypinska B. et al. Relationship between VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160769. DOI: 10.1371/journal.pone.0160769.
12. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Review Paper. Angiogenesis.* 2015; 18: 433–48. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
13. Gogiraju R., Bochenek M.L., Schäfer K. Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Review article. Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: 20. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00020.
14. Azizi G., Boghoozian R., Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2014; 17: 369–83. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1756-185X.12280>.
15. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Shibuya M., Neufeld G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (22): 18 688–94. DOI: 10.1074/jbc.M006909200.
16. Tsai Y.C., Fotinou C., Rana R., Yelland T., Frankel P., Zachary I. et al. Structural studies of neuropilin-2 reveal a zinc ion binding site remote from the vascular endothelial growth factor binding pocket. *FEBS J.* 2016; 283 (10): 1921–34. DOI: 10.1111/febs.13711.
17. De Rosa L., Di Stasi R., D'Andrea L.D. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 660 (15): 72–86. DOI: 10.1016/j.abb.2018.10.010.
18. Cardoso J.V., Machado D.E., Ferrari R., Silva M.C., Berardo P.T., Perini J.A. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2016; 16 (3): 219–32. DOI: 10.1590/1806-93042016000300002.
19. Yap R.W.K., Lin M.H., Shidoji Y., Yap W.S. Association of stress, mental health, and VEGFR-2 gene polymorphisms with cardiometabolic risk in Chinese Malaysian adults. *Nutrients.* 2019; 11 (5): 1140. DOI: 10.3390/nu11051140.
20. Li L., Pan Y., Dai L., Liu B., Zhang D. Association of genetic polymorphisms on vascular endothelial growth factor and its receptor genes with susceptibility to coronary heart disease. *Med. Sci. Monit.* 2016; 22: 31–40. DOI: 10.12659/MSM.895163.
21. Luo Y., Luo J., Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2019; 23 (9): 644–51. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0320.
22. Szekanecz Z., Koch A.E. Vascular involvement in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10 (5): 224. DOI: 10.1186/ar2515.
23. Vorlova S., Rocco G., LeFave C.V., Jodelka F.M., Hess K., Hastings M.L. et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol. Cell.* 2011; 43: 927–39. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.009.
24. Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* 2017; 136 (9): 1093–111. DOI: 10.1007/s00439-017-1809-4.
25. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* 2018; 59: 253–68. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7.
26. Zhao X., Meng L., Jiang J., Wu X. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Growth Factors.* 2018; 36 (3–4): 153–63. DOI: 10.1080/08977194.2018.1477141.
27. Ma W., Wang Y., Han X., Zhu Y., Liu N.-F. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2018; 19: 108. DOI: 10.1186/s12881-018-0628-3.
28. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y. et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (8): 760–7. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.04.074.
29. Slattey M.L., Lundgreen A., Wolff R.K. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol. Carcinog.* 2014; 53 (1): E140–50. DOI: 10.1002/mc.22058.
30. Dai X., Chen X., Hakizimana O., Mei Y. Genetic interactions between ANLN and KDR are prognostic for breast cancer survival. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (6): 2255–66. DOI: 10.3892/or.2019.7332.
31. Allegrini G., Coltelli L., Orlandi P., Fontana A., Camerini A., Ferro A. et al. Pharmacogenetic interaction analysis of VEGFR-2 and IL-8 polymorphisms in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and bevacizumab. *Pharmacogenomics.* 2014; 15 (16): 1985–99. DOI: 10.2217/pgs.14.140.
32. Breunis W.B., Davila S., Shimizu C., Oharaseki T., Takahashi K., van Houdt M. et al. Disruption of vascular homeostasis in patients with Kawasaki disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (1): 306–15. DOI: 10.1002/art.33316.
33. Guo H.-F., Kooi C.W.V. Neuropilin functions as an essential cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 29 120–6. DOI: 10.1074/jbc.R115.687327.
34. Leung G., Baggott C., West C., Elboim C., Paul S.M., Cooper B.A. et al. Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphat. Res. Biol.* 2014; 12 (1): 10–22. DOI: 10.1089/lrb.2013.0024.
35. Miaskowski C., Dodd M., Paul S.M., West C., Hamolsky D., Abrams G. et al. Lymphatic and angiogenic candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e60164. DOI: 10.1371/journal.pone.0060164.
36. Hosseinpour M., Mashayekhi F., Bidabadi E., Salehi Z. Neuropilin-2 rs849563 gene variations and susceptibility to autism in Iranian population: a case-control study. *Metab. Brain Dis.* 2017; 32 (5): 1471–4. DOI: 10.1007/s11011-017-0024-2.
37. Mitchell S.F., Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell.* 2014; 54 (4): 547–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.033.
38. Sharma Y., Miladi M., Dukare S., Boulay K., Caudron-Herger M., Groß M. et al. A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat. Commun.* 2019; 10: 2569. DOI: 10.1038/s41467-019-10489-2.
39. Chu D., Wei L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer.* 2019; 19: 359. DOI: 10.1186/s12885-019-5572-x.
40. Borrás N., Orriols G., Batlle J., Pérez-Rodríguez A., Fidalgo T., Martinho P. et al. Unraveling the effect of silent, intronic and missense mutations on vwf splicing: contribution of next generation sequencing in the study of mRNA. *Haematologica.* 2019; 104: 587–98. DOI: 10.3324/haematol.2018.203166.
41. Dhamijaa S., Menon M.B. Non-coding transcript variants of protein-coding genes – what are they good for? *Review. RNA Biol.* 2018; 15 (8): 1025–31. DOI: 10.1080/15476286.2018.1511675.
42. Dozmorov N.M. Disease classification: from phenotypic similarity to integrative genomics and beyond. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (5): 1769–80. DOI: 10.1093/bib/bby049.
43. Kontou P.I., Pavlopoulou A., Dimou N.L., Pavlopoulos G.A., Bagos P.G. Network analysis of genes and their association with diseases. *Gene.* 2016; 590 (1): 68–78. DOI: 10.1016/j.gene.2016.05.044.
44. Mi Z., Guo B., Yin Z., Li J., Zheng Z. Disease classification via gene network integrating modules and pathways. *R. Soc. Open Sci.* 2019; 6 (7): 190214. DOI: 10.1098/rsos.190214.

■ References

1. Hodkinson B., Tikly M., Adebajo A. Rheumatoid arthritis in the developing world: stepping up to the challenge. *Clin. Rheumatol.* 2014; 33 (9): 1195–6. DOI: 10.1007/s10067-014-2690-3.
2. Radner H., Lesperance T., Accortt N., Solomon D. Incidence and prevalence of cardiovascular risk factors among patients with rheumatoid arthritis, psoriasis, or psoriatic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017; 69 (10): 1510–8. DOI: 10.1002/acr.23171.
3. Nasonov E.L., Karateev D.E., Satybaldyev A.M. Rheumatoid arthritis in Russian Federation according to the Russian register of patients with arthritis (message 1). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2015; 5: 472–84. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-50-62. (in Russian)
4. Mulumba C., Lebughe P., Mbuyi-Muamba J.-M., Makulo J.-R., Lepira F., Mukaya J., et al. Prevalence and associated factors of subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis at the university hospital of Kinshasa. *BMC Rheum.* 2019; 3: 37. DOI: 10.1186/s14192-019-0085-4.
5. Avina-Zubieta J.A., Thomas J., Sadatsafavi M., Lehman A.J., Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71 (9): 1524–9. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200726.
6. Garza-García C., Rocio S.S., Orea-Tejeda A., Castillo-Martínez L., Eduardo C., López-Campos J.L., et al. Risk factors for asymptomatic vitreous dysfunction in rheumatoid arthritis patients. *ISRN Cardiol.* 2013; 2013: 635439. DOI: 10.1155/2013/635439.

7. Jaggal A., Navarro-Millán I. Cardiovascular co-morbidity in patients with rheumatoid arthritis: a narrative review of risk factors, cardiovascular risk assessment and treatment. *BMC Rheum.* 2018;2: 10. DOI: 10.1186/s41927-018-0014-y.
8. Skeoch S., Bruce I.N. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015; 11 (7): 390–400. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.40.
9. Sarli B., Baktir A.O., Cebicci M., Dogan Y., Demirbas M., Kurtul S., et al. Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology.* 2014; 65 (9): 778–82. DOI: 10.1177/0003319713504485.
10. Moraga A., Lao K.H., Zeng L. Angiogenesis and Cardiovascular Diseases: The Emerging Role of HDACs, Physiologic and Pathologic Angiogenesis – Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. Dan Simionescu and Agneta Simionescu. *IntechOpen.* 2017. DOI: 10.5772/66409. URL: <https://www.intechopen.com/books/physiologic-and-pathologic-angiogenesis-signaling-mechanisms-and-targeted-therapy/angiogenesis-and-cardiovascular-diseases-the-emerging-role-of-hdacs>.
11. Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., Haladyj E., Malinowski D., Stypinska B., et al. Relationship between VEGF gene polymorphisms and serum VEGF protein levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160769. DOI: 10.1371/journal.pone.0160769.
12. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Review Paper. Angiogenesis.* 2015; 18: 433–48. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
13. Gogiraju R., Bochenek M.L., Schäfer K. Angiogenic endothelial cell signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Review article. Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: 20. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00020.
14. Azizi G., Boghozian R., Mirshafiey A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2014; 17: 369–83. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/1756-185X.12280>.
15. Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Shibuya M., Neufeld G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (22): 18 688–94. DOI: 10.1074/jbc.M006909200.
16. Tsai Y.C., Fotinou C., Rana R., Yelland T., Frankel P., Zachary I., et al. Structural studies of neuropilin-2 reveal a zinc ion binding site remote from the vascular endothelial growth factor binding pocket. *FEBS J.* 2016; 283 (10): 1921–34. DOI: 10.1111/febs.13711.
17. De Rosa L., Di Stasi R., D’Andrea L.D. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Arch. Biochem. Biophys.* 2018; 660 (15): 72–86. DOI: 10.1016/j.abb.2018.10.010.
18. Cardoso J.V., Machado D.E., Ferrari R., Silva M.C., Berardo P.T., Perini J.A. Polymorphisms in VEGF and KDR genes in the development of endometriosis: a systematic review. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2016; 16 (3): 219–32. DOI: 10.1590/1806-93042016000300002.
19. Yap R.W. K., Lin M.H., Shidoji Y., Yap W.S. Association of stress, mental health, and VEGFR-2 gene polymorphisms with cardiometabolic risk in Chinese Malaysian adults. *Nutrients.* 2019; 11 (5): 1140. DOI: 10.3390/nu11051140.
20. Li L., Pan Y., Dai L., Liu B., Zhang D. Association of genetic polymorphisms on vascular endothelial growth factor and its receptor genes with susceptibility to coronary heart disease. *Med. Sci. Monit.* 2016; 22: 31–40. DOI: 10.12659/MSM.895163.
21. Luo Y., Luo J., Peng H. Associations between genetic polymorphisms in the VEGFA, ACE, and SOD2 genes and susceptibility to diabetic nephropathy in the Han Chinese. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2019; 23 (9): 644–51. DOI: 10.1089/gtmb.2018.0320.
22. Szekanecz Z., Koch A.E. Vascular involvement in rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10 (5): 224. DOI: 10.1186/ar2515.
23. Vorlova S., Rocco G., LeFave C.V., Jodelka F.M., Hess K., Hastings M.L., et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol. Cell.* 2011; 43: 927–39. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.009.
24. Vaz-Drago R., Custódio N., Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum. Genet.* 2017; 136 (9): 1093–111. DOI: 10.1007/s00439-017-1809-4.
25. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* 2018; 59: 253–68. DOI: 10.1007/s13353-018-0444-7.
26. Zhao X., Meng L., Jiang J., Wu X. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Growth Factors.* 2018; 36 (3–4): 153–63. DOI: 10.1080/08977194.2018.1477141.
27. Ma W., Wang Y., Han X., Zhu Y., Liu N.-F. Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2018; 19: 108. DOI: 10.1186/s12881-018-0628-3.
28. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y., et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (8): 760–7. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.04.074.
29. Slattey M.L., Lundgreen A., Wolff R.K. VEGFA, FLT1, KDR and colorectal cancer: assessment of disease risk, tumor molecular phenotype, and survival. *Mol. Carcinog.* 2014; 53 (1): E140–50. DOI: 10.1002/mc.22058.
30. Dai X., Chen X., Hakizimana O., Mei Y. Genetic interactions between ANLN and KDR are prognostic for breast cancer survival. *Oncol. Rep.* 2019; 42 (6): 2255–66. DOI: 10.3892/or.2019.7332.
31. Allegrini G., Coltelli L., Orlandi P., Fontana A., Camerini A., Ferro A., et al. Pharmacogenetic interaction analysis of VEGFR-2 and IL-8 polymorphisms in advanced breast cancer patients treated with paclitaxel and bevacizumab. *Pharmacogenomics.* 2014; 15 (16): 1985–99. DOI: 10.2217/pgs.14.140.
32. Breunis W.B., Davila S., Shimizu C., Oharaseki T., Takahashi K., van Houdt M., et al. Disruption of vascular homeostasis in patients with Kawasaki disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and angiopoietins. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (1): 306–15. DOI: 10.1002/art.33316.
33. Guo H.-F., Kooi C.W.V. Neuropilin functions as an essential cell surface receptor. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 29 120–6. DOI: 10.1074/jbc.R115.687327.
34. Leung G., Baggott C., West C., Elboim C., Paul S.M., Cooper B.A., et al. Cytokine candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *Lymphat. Res. Biol.* 2014; 12 (1): 10–22. DOI: 10.1089/lrb.2013.0024.
35. Miaskowski C., Dodd M., Paul S.M., West C., Hamolsky D., Abrams G., et al. Lymphatic and angiogenic candidate genes predict the development of secondary lymphedema following breast cancer surgery. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e60164. DOI: 10.1371/journal.pone.0060164.
36. Hosseinpour M., Mashayekhi F., Bidabadi E., Salehi Z. Neuropilin-2 rs849563 gene variations and susceptibility to autism in Iranian population: a case-control study. *Metab. Brain Dis.* 2017; 32 (5): 1471–4. DOI: 10.1007/s11011-017-0024-2.
37. Mitchell S.F., Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell.* 2014; 54 (4): 547–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.04.033.
38. Sharma Y., Miladi M., Dukare S., Boulay K., Caudron-Herger M., Groß M., et al. A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat. Commun.* 2019; 10: 2569. DOI: 10.1038/s41467-019-10489-2.
39. Chu D., Wei L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer.* 2019; 19: 359. DOI: 10.1186/s12885-019-5572-x.
40. Borràs N., Orriols G., Batlle J., Pérez-Rodríguez A., Fidalgo T., Martinho P., et al. Unraveling the effect of silent, intronic and missense mutations on vwf splicing: contribution of next generation sequencing in the study of mRNA. *Haematologica.* 2019; 104: 587–98. DOI: 10.3324/haematol.2018.203166.
41. Dhamijaa S., Menon M.B. Non-coding transcript variants of protein-coding genes – what are they good for? *Review. RNA Biol.* 2018; 15 (8): 1025–31. DOI: 10.1080/15476286.2018.1511675.
42. Dozmorov M. Disease classification: from phenotypic similarity to integrative genomics and beyond. *Brief. Bioinform.* 2019; 20 (5): 1769–80. DOI: 10.1093/bib/bby049.
43. Kontou P.I., Pavlopoulou A., Dimou N.L., Pavlopoulos G.A., Bagos P.G. Network analysis of genes and their association with diseases. *Gene.* 2016; 590 (1): 68–78. DOI: 10.1016/j.gene.2016.05.044.
44. Mi Z., Guo B., Yin Z., Li J., Zheng Z. Disease classification via gene network integrating modules and pathways. *R. Soc. Open Sci.* 2019; 6 (7): 190214. DOI: 10.1098/rsos.190214.

© Коллектив авторов, 2020

Терещенко В.П.¹, Булыгин А.С.¹, Заводский Р.Ю.², Куликова Е.В.¹,
Сенников С.В.^{1,3}

Получение дендритных клеток мышей *in vitro* с помощью Flt3-L и их характеристика

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630099, г. Новосибирск, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630091, г. Новосибирск, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

Введение. В настоящее время для модуляции адаптивного иммунного ответа с целью коррекции тех или иных заболеваний человека активно разрабатываются клеточные вакцины на основе миелоидных дендритных клеток (мДК). Однако об эффективности применения плазматоидных дендритных клеток (пДК) в тех же целях все еще мало данных.

Цель исследования – разработка протокола получения пДК мышей с помощью рекомбинантного Flt3-L *in vitro* и описание фенотипических и функциональных свойств полученных дендритных клеток (ДК) для решения вопроса о возможности их использования при создании клеточных вакцин.

Материал и методы. ДК получали путем культивирования клеток костного мозга мышей в присутствии Flt3-L. Относительное количество и фенотип ДК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, а морфологию ДК – с помощью флуоресцентной микроскопии. Функциональные свойства ДК изучали по их способности индуцировать Трег-клетки и пролиферацию CD4⁺-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов. Экспрессию рецептора хемотаксиса CCR9 на ДК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Показано, что с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно *in vitro* получение культур ДК с относительно высоким содержанием B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в полученных культурах отличались морфологией и степенью зрелости. В смешанной культуре лимфоцитов полученные *in vitro* ДК, обладали свойствами незрелых ДК, что проявлялось в их способности генерировать повышенное количество Трег и вызывать сниженную пролиферацию CD4⁺-лимфоцитов. При стимуляции полученных ДК с помощью CpG ДНК наблюдалось их созревание, и снижение способности к индукции Трег и увеличение способности к индукции пролиферации CD4⁺-лимфоцитов, т. е. приобретение иммуногенной функции. Относительно небольшое количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК несли на поверхности рецептор хемотаксиса CCR9, однако количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих CCR9 внутриклеточно, стремилось к 100 %.

Заключение. Таким образом, с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно *in vitro* получение культур B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, пригодных к применению при разработке клеточных вакцин для подавления нежелательного адаптивного иммунного ответа и для индукции желательного.

Ключевые слова: Flt3-L; плазматоидные дендритные клетки; миелоидные дендритные клетки; CCR9

Статья поступила 03.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Терещенко В.П., Булыгин А.С., Заводский Р.Ю., Куликова Е.В., Сенников С.В. Получение дендритных клеток мышей *in vitro* с помощью Flt3-L и их характеристика. Иммунология. 2020; 41 (3): 215–226. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-215-226

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00086).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Сенников Сергей Витальевич –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии
ФГБНУ НИИФКИ
Минобрнауки России, Новосибирск,
Российская Федерация
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Tereshchenko V.P.¹, Bulygin A.S.¹, Zavodskii R.Yu.², Kulikova E.V.¹,
Sennikov S.V.^{1,3}

Generation of murine dendritic cells *in vitro* using Flt3-L and their characteristics

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, 630091, Novosibirsk, Russian Federation

³ Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Introduction. Currently, cell vaccines based on myeloid dendritic cells (mDCs) are being actively developed to modulate an adaptive immune response in order to correct certain human diseases. However, there is still little data on the effectiveness of the use of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) for the same purposes.

Aim of the study. Development of the protocol for *in vitro* generation of mice pDCs using recombinant Flt3-L and description of the phenotypic and functional properties of the obtained dendritic cells (DCs) to address the possibility of their use in the development of cell vaccines.

Material and methods. DCs were generated from mouse bone marrow cells using Flt3-L. Frequency and phenotype of the DCs were assessed by flow cytometry. DC's morphology was assessed using fluorescent microscopy. Treg frequency and CD4⁺-lymphocytes proliferation induced by DCs were assessed in mixed lymphocyte culture. The expression of CCR9 on DCs was assessed using flow cytometry.

Results. It was shown that the use of Flt3-L provides *in vitro* generation of bone marrow-derived cultures with a relatively high content of B220⁺CD11c⁺-pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs. The B220⁺CD11c⁺-pDCs and the Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs obtained differed in morphology and degree of maturity. In a mixed lymphocytes culture, the dendritic cells were able to generate an increased amount of Treg and cause a reduced proliferation of CD4⁺-lymphocytes, thus manifesting an immature phenotype. Further maturation of the DCs via CpG DNA stimulation led to an increased immunogenicity, according the Treg reduction and enhanced CD4⁺-lymphocytes proliferation in mixed lymphocytes culture. We found that a relatively small number of B220⁺CD11c⁺-pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs carried the CCR9 chemotaxis receptor on their surface, however, the number of B220⁺CD11c⁺-pDCs and the Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs carrying intracellular CCR9 tended to 100 %. Thus, the use of Flt3-L provides the opportunity of *in vitro* generation of B220⁺CD11c⁺ pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs that can be useful in the field of cell vaccine development to direct an adaptive immune response decreasing undesirable immune reactions or increasing desirable.

Keywords: Flt3-L; plasmacytoid dendritic cells; myeloid dendritic cells; CCR9

Received 03.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Tereshchenko V.P., Bulygin A.S., Zavodskii R.Yu., Kulikova E.V., Sennikov S.V. Generation of murine dendritic cells *in vitro* using Flt3-L and their characteristics. Immunologiya. 2019; 41(3): 215–26. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-215-226 (in Russian)

Funding. The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project no.16-15-00086).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

В настоящее время для коррекции тех или иных заболеваний человека активно разрабатываются подходы к модуляции адаптивного иммунного ответа с помощью дендритных клеток (ДК). Так, ДК предложено использовать для индукции противоопухолевого иммунного ответа [1, 2], подавления патологического иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях [3–5] и супрессии

трансплантационных реакций, таких как реакция отторжения [6] и реакция «трансплантат против хозяина» [7].

Однако для всех этих целей применяют миелоидные ДК (мДК), полученные из моноцитов периферической крови человека или костного мозга мышей с помощью ГМ-КСФ. При этом свойства и эффективность плазматоидных ДК (пДК) в тех же моделях остаются малоизученными.

For correspondence

Sergey V. Sennikov –
MD, PhD, Professor,
Head of Laboratory
of molecular immunology
RIFCI, Novosibirsk,
Russian Federation
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Применение пДК может быть особенно целесообразно при необходимости индукции иммунной толерантности, т. е. подавления нежелательного иммунного ответа, поскольку показано активное участие незрелых $B220^+CD11c^+$ -пДК в негативной селекции тимоцитов и поддержании центральной иммунной толерантности. Так, незрелые $B220^+CD11c^+$ -пДК захватывают в периферических тканях собственные антигены и под действием сигналов рецептора хемотаксиса CCR9 мигрируют в тимус, где, представляя захваченные антигены развивающимся тимоцитам, обеспечивают процесс негативной селекции и поддержание центральной иммунной толерантности к собственным антигенам [8].

$B220^+CD11c^+$ -пДК могут быть получены с помощью Flt3-L – фактора роста ДК. *In vivo* получение пДК осуществляется с помощью введения лабораторным животным клеточной линии, экспрессирующей Flt3-L, и последующего выделения $B220^+CD11c^+$ -пДК из лимфоидных органов животного [9–12]. Данный метод позволяет генерировать *in vivo* незрелые пДК с фенотипом, не отличающимся от фенотипа пДК, полученных в физиологических условиях [9]. Однако в результате данного способа получают относительно небольшие количества $B220^+CD11c^+$ -пДК (около 15 % от всех $CD11c^+$ -ДК, при-

сутствующих в лимфоидных органах [11]), чего может быть недостаточно для реализации клеточных технологий модуляции иммунного ответа. Более того, данный способ – введение реципиенту Flt3-L-продуцирующих клеточных линий – не может быть применен для человека при трансляции подобных технологий в клиническую практику.

Альтернативой является генерация $B220^+CD11c^+$ -пДК с помощью рекомбинантного Flt3-L *in vitro*. Так, $B220^+CD11c^+$ -пДК получают при культивировании отсортированных предшественников ДК [13, 14] или костного мозга мышей [15, 16] в присутствии различных доз рекомбинантного Flt3-L. Однако функциональные и фенотипические свойства генерируемых *in vitro* $B220^+CD11c^+$ -пДК, а также экспрессия ими CCR9, отражающая способность клеток мигрировать к источнику его лиганда CCL25 (например, в тимус) [9, 17], слабо охарактеризованы.

Таким образом, для решения вопроса о возможности использования $B220^+CD11c^+$ -пДК, индуцированных *in vitro* с помощью рекомбинантного Flt3-L, для модуляции иммунного ответа требуется отработать протокол получения достаточного количества ДК и охарактеризовать фенотипические и функциональные свойства получаемых ДК, что и стало целью данного исследования.

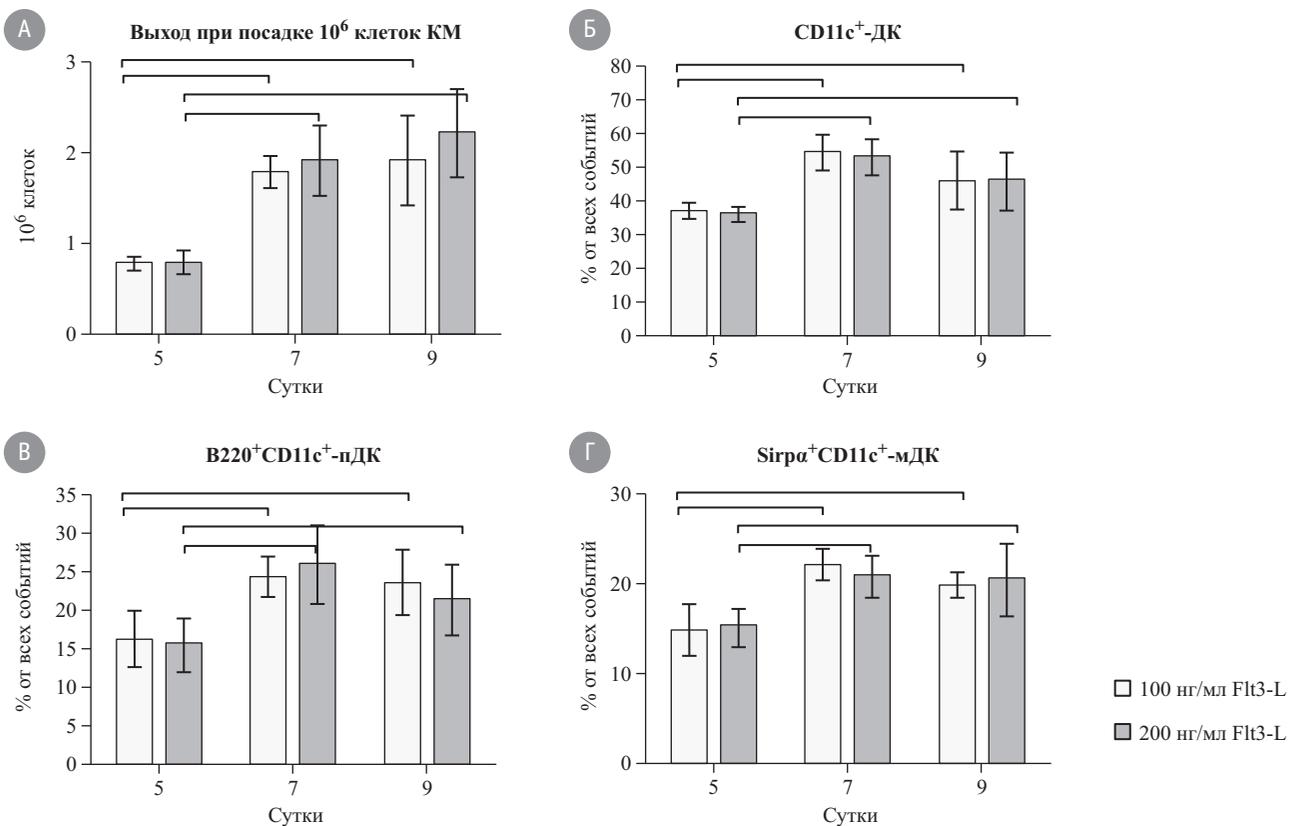


Рис. 1. Культуры дендритных клеток (ДК) на 5, 7 или 9-е сутки, полученные с помощью 100 или 200 нг/мл Flt3-L

А – абсолютное количество получаемых клеток при посадке 10^6 клеток костного мозга (КМ); Б – относительное количество полученных $CD11c^+$ -ДК в культуре; В – относительное количество полученных $B220^+CD11c^+$ -пДК в культуре; Г – относительное количество полученных $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК в культуре; $n = 6$. Здесь и на рис. 4, 5 скобками указаны статистически значимые отличия (двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки, $p \leq 0,05$).

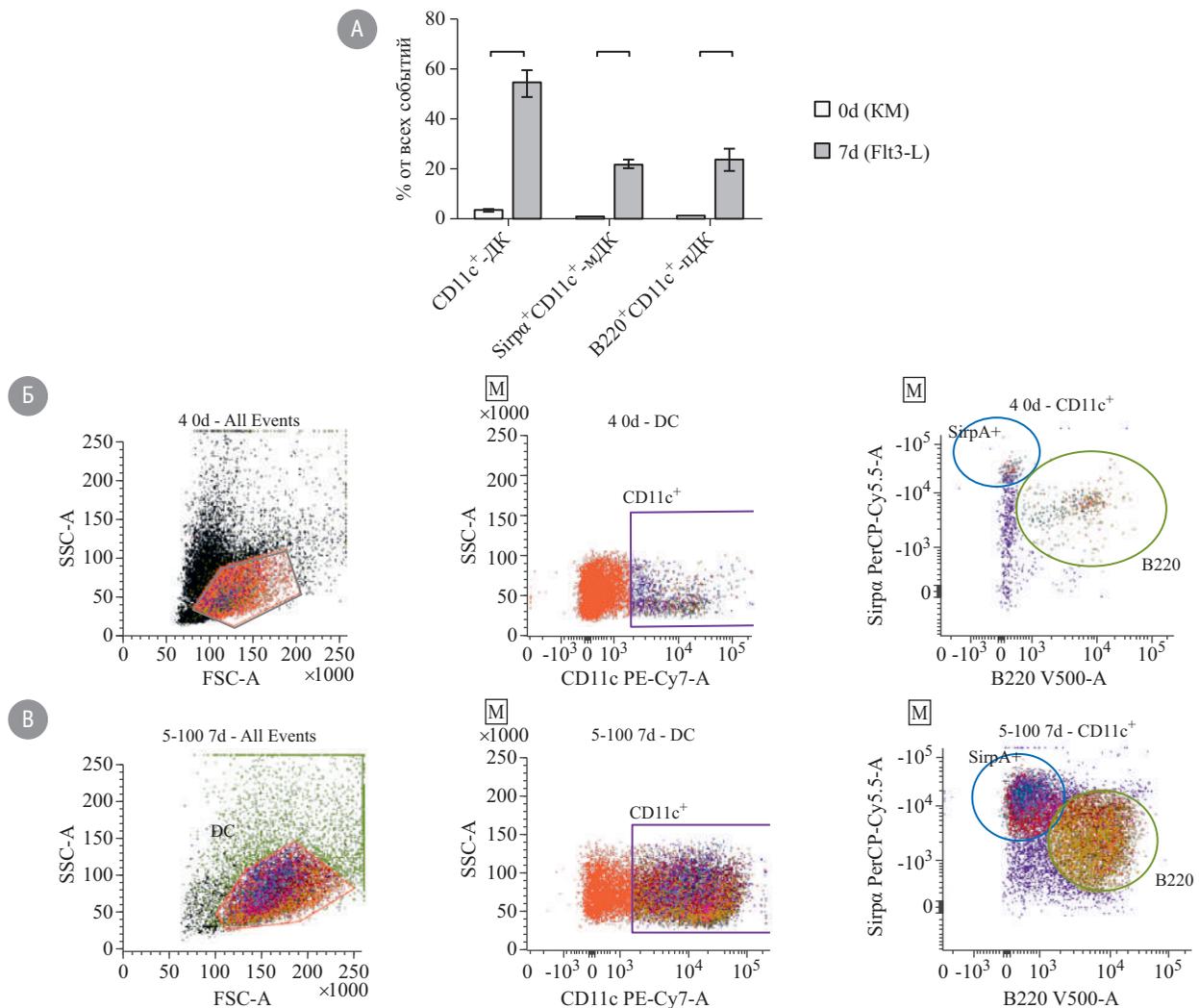


Рис. 2. Содержание B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в костном мозге мышей и культурах дендритных клеток (ДК), полученных с помощью Flt3-L за 7 сут

A – относительные количества ДК в костном мозге (0d) и культурах, полученных с помощью Flt3-L за 7 сут, $n = 6$. Скобками указаны достоверные отличия (t -тест, $p \leq 0,05$); *B* – пример цитофлуориметрии ДК костного мозга; *B* – пример цитофлуориметрии ДК, полученных с помощью Flt3-L к 7-м суткам.

Материал и методы

Лабораторные животные. В исследовании использовали самцов мышей C57BL/6 и BALB/c в возрасте 2–6 мес. Мышей содержали в виварии ФГБНУ НИИФКИ Минобрнауки России в условиях естественного освещения и неограниченного доступа к еде и воде.

Получение культур дендритных клеток. Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей мышей C57BL/6 промыванием костномозгового канала фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Далее клетки центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640. Клетки высаживали в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария) по 1×10^6 клеток на лунку в 1 мл полной среде RPMI-1640. В лунки добавляли Flt3-L (R&D systems, США) в концентрации 100 нг/мл или 200 нг/мл. Половину среды с фактором роста меняли каждые 2–3 сут. Культуры снимали на 5, 7

и 9-е сутки для цитометрического анализа. В экспериментах по анализу фенотипа ДК после созревания, а также в экспериментах смешанной культуры лимфоцитов на последние сутки культивирования к дендритным клеткам добавляли 2 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) O55:B5 (Sigma, США) или 6 мкг/мл CpG ODN 1826 ДНК (Invivogen, США).

Смешанная культура лимфоцитов. Смешанную культуру лимфоцитов получали путем сокультивирования ДК мышей C57BL/6 с CD4⁺-лимфоцитами мышей BALB/c. ДК мышей C57BL/6 получали с помощью культивирования клеток костного мозга в течение 7 сут в присутствии 100 нг/мл Flt3-L с или без добавления ЛПС или CpG ДНК на последние сутки культивирования. CD4⁺-лимфоциты мышей BALB/c получали путем магнитной сортировки спленоцитов мышей BALB/c с помощью коммерческого набора CD4 MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec, США). Чистота сортировки составляла 98–99 %. Половину полученных CD4⁺-

лимфоцитов метили витальным красителем CFSE путем инкубирования 10–12 млн клеток в 1 мл ФСБ с 5,6 мкг CFSE в течение 10–15 мин с последующей 2-кратной отмывкой в ФСБ с 50 % FCS. ДК мышей C57Bl/6 со-культивировали с CD4⁺-лимфоцитами мышей BALB/c в соотношении 1:10 в течении 5 сут со сменой ½ объема среды на 3-и сутки культивирования. Через 5 сут сокультивирования в полученных культурах методом проточной цитометрии оценивали относительное количество CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и уровень пролиферации CFSE-меченых CD4⁺-лимфоцитов.

Цитометрия. Для цитометрического анализа культуры ДК снимали на 5, 7, 9-е сутки культивирования и разводили в концентрации 0,5 млн клеток на 100 мкл полной среды RPMI-1640. Клеточные суспензии метили антителами, конъюгированными с флуорохромами: CD11c – Pe/Cy7; B220 – BV510, Sirpα – PercP/Cy5.5; PDCA-1 – BV421; CCR9 – PE; I-A(b) – APC; CD83 – FITC; CD86 – APC/Cy7 (Biolegend, США), 20 мин в темноте при комнатной температуре. Внутриклеточное мечение CCR9 проводили с помощью антитела антиCCR9-PE (Biolegend, США) и коммерческого набора для фиксации и пермеабиллизации True-Nuclear™ Transcription Factor Staining (Biolegend, США) согласно инструкции производителя. Меченые суспензии клеток отмывали однократно в 2 мл ФСБ с NaN₃ и анализировали на проточном цитометре BD FACSVerse (BD, США).

Для оценки относительного количества FoxP3⁺-Трег-клеток в смешанной культуре лимфоцитов 0,5 млн клеток полученных культур разводили в 100 мкл полной среды RPMI-1640 и метили антителами к поверхностным антигенам CD3 – BV421, CD4 – PerCP, CD25 – FITC (Biolegend, США). Мечение внутриядерного транскрипционного фактора FoxP3 проводили с помощью антитела анти-FoxP3-PE (Biolegend, США) и коммерческого набора для фиксации и пермеабиллизации True-Nuclear™ Transcription Factor Staining (Biolegend, США), согласно инструкции производителя.

Пролиферацию в смешанной культуре лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии по уменьшению флуоресценции CFSE в делящихся клетках.

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии культуры ДК снимали и метили антителами анти-B220-BV510, анти-Sirpα-PercP/Cy5.5 (Biolegend, США) 20 мин в темноте. Далее клетки отмывали в растворе ФСБ и высаживали в 24-луночные пластиковые планшеты (TPP, Швейцария). Через 4 ч выполняли флуоресцентную микроскопию на аппарате InCell Analyzer 6000 (GE, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Согласно тесту Шапиро–Уилка, все исследованные выборки имели нормальное распределение. Значимость различий между выборками оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа с множественными сравнениями по Сидaku или Тьюки и *t*-тестом (конкретный статистический метод указан в подписях к рисункам). Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Значимые отличия проиллюстрированы на рисунках скобками. Данные на гистограммах показывают среднюю и стандартное отклонение.

Результаты

Количество дендритных клеток, получаемых *in vitro* с помощью Flt3-L

Согласно данным литературы, для получения B220⁺CD11c⁺-пДК *in vitro* применяется культивирование предшественников ДК, отсортированных из костного мозга мышей, в присутствии 100 нг/мл Flt3-L в течение 6–9 сут [13, 14]. Также для получения B220⁺CD11c⁺-пДК возможно культивирование клеток костного мозга мышей в присутствии 200 нг/мл Flt3-L в течение 7–9 сут [15, 16]. Поэтому для генерации B220⁺CD11c⁺-пДК было решено опробовать протоколы культивирования клеток костного мозга мышей C57Bl/6 в течение 5, 7, 9 дней в присутствии 100 или 200 нг/мл Flt3-L.

Абсолютное количество клеток, генерируемых в культурах под действием 100 и 200 нг/мл Flt3-L, оказалось значимо больше на 7 и 9-е сутки по сравнению с 5-ми сутками (рис. 1А). Также на 7 и 9-е сутки в куль-

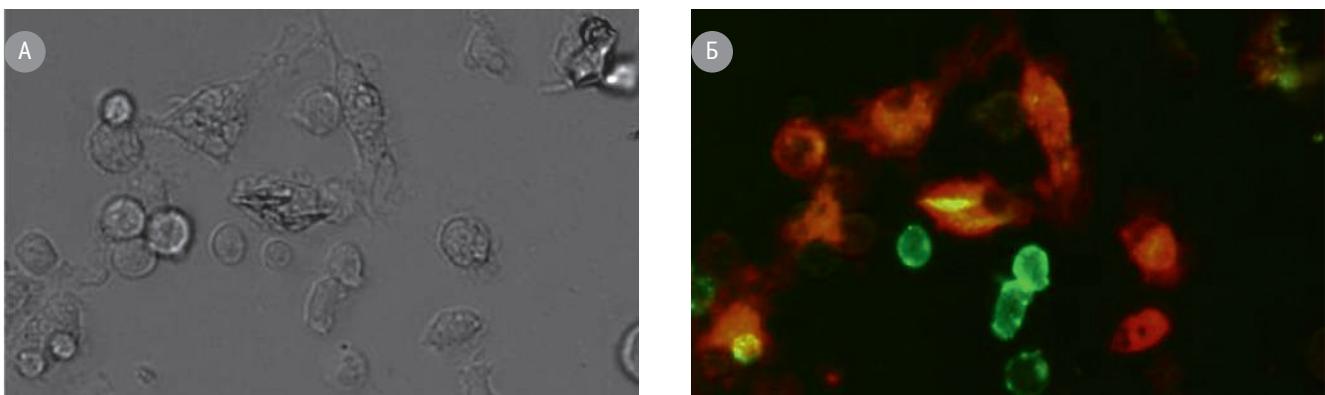


Рис. 3. Микроскопия культур дендритных клеток (ДК), полученных с помощью Flt3-L

А – микроскопия в проходящем свете; Б – флуоресцентная микроскопия того же фрагмента; зеленым цветом выделены пДК, меченые анти-B220-BV510; красным – мДК, меченые анти-Sirpα-PercP/Cy5.5. ×20.

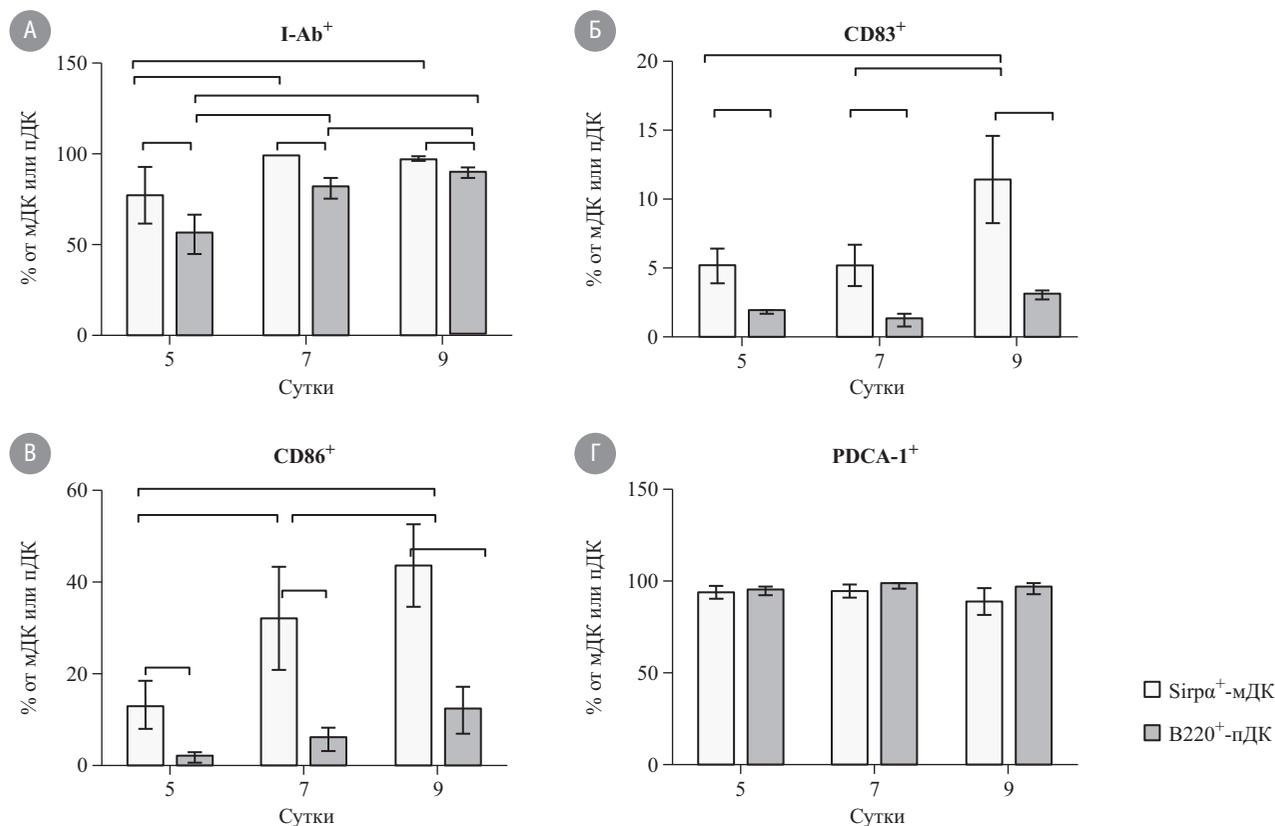


Рис. 4. Фенотип B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных *in vitro* с помощью 100 нг/мл Flt3-L. Относительное количество клеток, несущих: I-Ab (МНС II) (А), CD83 (Б), CD86 (В); PDCA-1 (Г); n = 6.

турах наблюдалось значимо большее относительное количество CD11c⁺-ДК и B220⁺CD11c⁺-пДК по сравнению с 5-ми сутками (рис. 1Б, В). Под действием Flt3-L в культурах также наблюдалась генерация Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в количествах, сопоставимых с количеством B220⁺CD11c⁺-пДК (рис. 1Г).

Две выбранные дозы Flt3-L не отличались значимо в своей способности генерировать изучаемые виды ДК в культурах. Также количества всех изучаемых видов ДК значимо не отличались на 7 и 9-е сутки культивирования при использовании обеих выбранных доз Flt3-L (см. рис. 1).

Для определения целесообразности генерации B220⁺CD11c⁺-пДК *in vitro* с помощью Flt3-L было изучено количество ДК в костном мозге мышей сразу после его выделения. Относительные количества CD11c⁺-ДК, B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в костном мозге оказались значимо меньшими по сравнению с относительными количествами аналогичных ДК, генерируемых *in vitro* с помощью Flt3-L к 7-м суткам (рис. 2А). Пример цитофлуориметрии ДК костного мозга и культур ДК, полученных с помощью Flt3-L представлен на рис. 2 (Б, В).

Морфология и фенотип дендритных клеток, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

Морфологически B220⁺CD11c⁺-пДК имели округлую или неправильную округлую форму с единичными

мелкими отростками (рис. 3). Sirpα⁺CD11c⁺-мДК являлись более крупными клетками с фибробластоподобной морфологией (см. рис. 3).

Относительные количества B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, экспрессирующих на своей поверхности I-Ab (МНС II), CD83 и CD86, увеличивались с возрастанием сроков культивирования (рис. 4А–В). При этом экспрессия данных молекул обнаруживалась на значимо большем количестве Sirpα⁺CD11c⁺-мДК по сравнению с B220⁺CD11c⁺-пДК на всех исследуемых сроках культивирования. Экспрессия специфического для пДК маркера PDCA-1 наблюдалась на большинстве B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на всех исследуемых сроках культивирования (рис. 4Г). Описанная картина наблюдалась при использовании обеих выбранных доз Flt3-L. При этом фенотип ДК, полученных с помощью 100 и 200 нг/мл Flt3-L, значимо не отличался.

По сравнению с ДК, полученными в культурах, значимо меньшее количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК костного мозга экспрессировали I-Ab (МНС II) (рис. 5). Также относительное количество PDCA-1⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК костного мозга оказалось значительно ниже по сравнению с относительным количеством PDCA-1⁺B220⁺CD11c⁺-пДК костного мозга и PDCA-1⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных в культурах (см. рис. 5).

При стимуляции полученных культур ДК ЛПС или CpG ДНК значимо увеличивалось относительное ко-

личество $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК экспрессирующих CD83 и CD86, при этом относительное количество $I-Ab^+Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК значительно снижалось (см. рис. 5). Аналогичный характер ответа на стимуляцию демонстрировали и ДК костного мозга. Но также при стимуляции ДК костного мозга ЛПС или CpG ДНК происходило значимое увеличение относительного количества $I-Ab^+B220^+CD11c^+$ -пДК и $PDCA-1^+Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК и снижение $PDCA-1^+B220^+CD11c^+$ -пДК (см. рис. 5).

Функциональные свойства дендритных клеток, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

В смешанной культуре лимфоцитов ДК, полученные за 7 сут с помощью 100 нг/мл Flt3-L, вызывали генерацию значительно большего количества $CD25^{high}FoxP3^+$ -Трег и значительно меньшего количества пролиферирующих $CD4^+$ -лимфоцитов по сравнению с культурами ДК, стимулированными CpG ДНК и по сравнению с количествами аналогичных клеток, присутствующих в $CD4^+$ -лимфоцитах, нестимулированных ДК (рис. 6). При этом нестимулированные культуры ДК и культуры, стимулированные ЛПС, не отличались значимо в своей способности генерировать Трег и индуцировать пролиферацию $CD4^+$ -лимфоцитов.

Характеристика экспрессии CCR9 на дендритных клетках костного мозга и дендритных клетках, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

Относительно небольшое количество $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК свежевыделенного костного мозга и полученных 7-дневных культур имели на своей поверхности CCR9 (рис. 7А). Также средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9,

меченного антителом, на данных клетках принимала относительно низкие значения (рис. 7Б). Однако было отмечено, что через сутки после забора костного мозга в культурах значимо увеличивалось относительное количество $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК, несущих на своей поверхности CCR9. При этом количество $CCR9^+B220^+CD11c^+$ -пДК на 1-е сутки культивирования оказалось значимо больше по сравнению с количеством $CCR9^+Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК (рис. 7А). Средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9, меченного антителом, проявляла аналогичный характер изменений на 1-е сутки культивирования (рис. 7Б). Пример цитометрии поверхностного CCR9 на $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК на 0, 1 и 7-е сутки культивирования приведен на рис. 7 (В–Д).

Также было выявлено, что на всех сроках культивирования CCR9 локализуется преимущественно внутриклеточно, что проявлялось в относительно высоком количестве $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК, позитивных по CCR9 при внутриклеточном окрашивании, а также в относительно высоких значениях средней геометрической интенсивности флуоресценции CCR9, меченого внутриклеточно (рис. 8А, Б). При этом количество $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК, несущих CCR9 внутриклеточно, а также средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9, меченого внутриклеточно, в $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК возрастали с увеличением сроков культивирования. Количество $B220^+CD11c^+$ -пДК, несущих CCR9 внутриклеточно, на всех исследуемых сроках стремилось к 100%. Средняя геометрическая интенсивности флуоресценции внутриклеточно меченого CCR9 в $B220^+CD11c^+$ -пДК на 1 и 7-е сутки культивирования

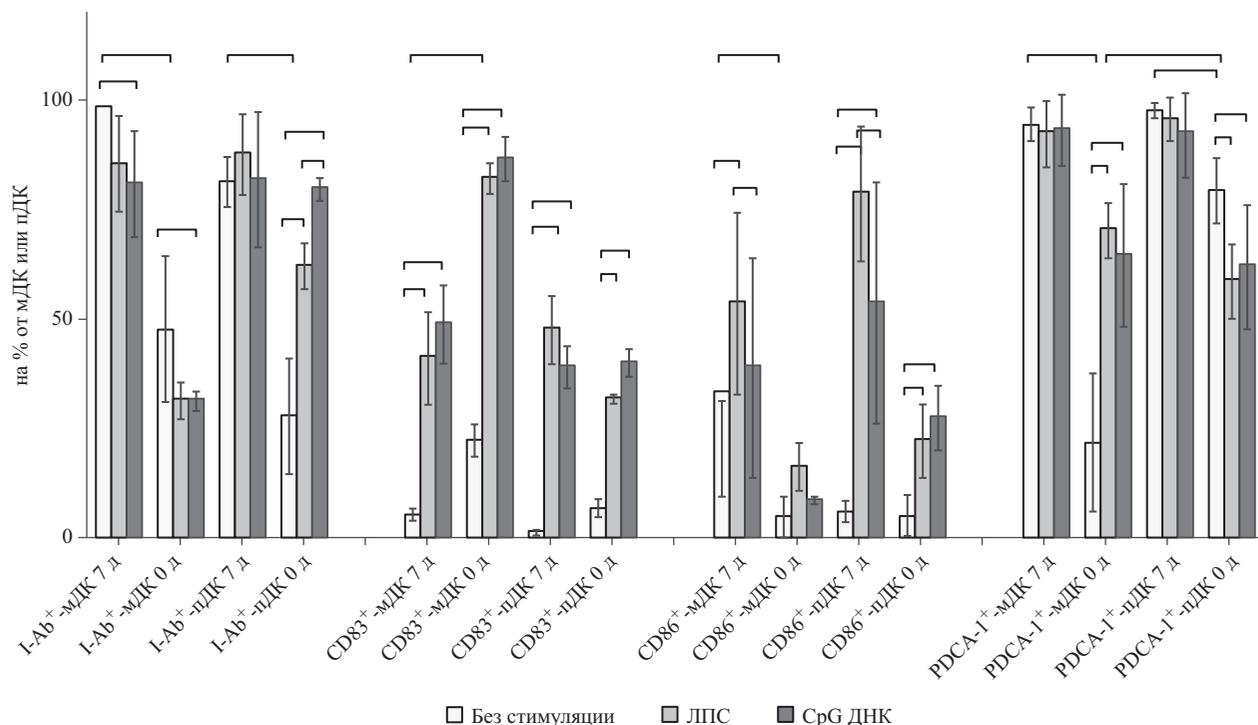


Рис. 5. Фенотип $B220^+CD11c^+$ -пДК и $Sirp\alpha^+CD11c^+$ -мДК костного мозга (0-й день) и полученных культур (7-й день), нестимулированных или стимулированных липополисахаридом (ЛПС) или CpG ДНК, $n = 6$

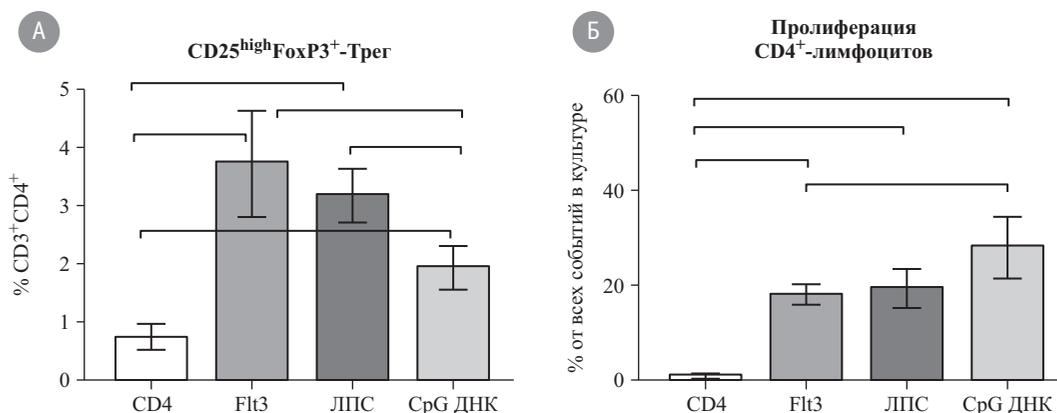


Рис. 6. Генерация CD25^{high}FoxP3⁺-Treg (A) и пролиферация CD4⁺-лимфоцитов (Б) в смешанных культурах CD4⁺-лимфоцитов мышей BALB/c и дендритных клеток (ДК) мышей C57Bl/6, полученных с помощью Flt3-L

ЛПС – липополисахарид. Скобками указаны статистически значимые отличия (однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки, $p \leq 0,05$), $n = 6$.

достигала максимальных из наблюдаемых во всем эксперименте значений (рис. 8А, Б). Примеры цитометрии внутриклеточно локализованного CCR9 приведены на рис. 8В–Д.

Добавление к свежeweделенным клеткам костного мозга CCL25 – лиганда CCR9 – в дозировках 20, 40, 80, 160 нг/мл значимо не влияло на относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих CCR9 поверхностно и внутриклеточно после 1-х суток культивирования, и на среднюю геометрическую интенсивности флуоресценции CCR9, меченого поверхностно и внутриклеточно (рис. 9).

Обсуждение

В настоящем исследовании был отработан протокол получения B220⁺CD11c⁺-пДК с помощью Flt3-L *in vitro*, а также проведена фенотипическая и функциональная характеристика полученных клеток для решения вопроса о возможности их использования при разработке клеточных технологий модуляции иммунного ответа.

Результаты показали, что культивирование клеток костного мозга мышей в присутствии Flt3-L в течение 7 сут приводит к почти двукратному увеличению абсолютного количества клеток в культурах (см. рис. 1А). При этом около 25 % из всех полученных клеток в культурах составляли B220⁺CD11c⁺-пДК (см. рис. 1В), что больше, чем относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК, присутствующее в лимфоидных органах мышей, стимулированных Flt3-L-продуцирующей клеточной линией (15 %) [11] и больше, чем относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК, присутствующее в костном мозге мышей в физиологических условиях (см. рис. 2А).

В присутствии Flt3-L к 7-м суткам в культурах клеток костного мозга также генерировалось значимое количество (около 20 % от общего количества клеток в культурах, см. рис. 1Г) Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. Поскольку мДК в современных исследованиях генерируют в ос-

новном с помощью ГМ-КСФ [1–7] и, таким образом, свойства мДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L, также слабо изучены, полученные Sirpα⁺CD11c⁺-мДК были включены в дальнейший анализ.

Используемые в проведенном исследовании дозы Flt3-L в 100 и 200 нг/мл не отличались значимо в своей способности генерировать какой-либо вид ДК в культурах клеток костного мозга (см. рис. 1), что позволяет снизить предложенную в некоторых источниках литературы дозу Flt3-L в 200 нг/мл [15, 16] для генерации ДК из клеток костного мозга.

B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L, обладали различной морфологией. Так, B220⁺CD11c⁺-пДК имели круглую или неправильную округлую форму с единичными мелкими дендритными отростками, в то время как Sirpα⁺CD11c⁺-мДК являлись более крупным фибробластоподобными клетками (см. рис. 3).

Как показал анализ экспрессии МНС II (I-Ab), маркера зрелости CD83 и костимуляторной молекулы CD86, B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК увеличивали степень зрелости с возрастанием сроков культивирования (см. рис. 4А–В). При этом Sirpα⁺CD11c⁺-мДК обладали более зрелым фенотипом по сравнению с B220⁺CD11c⁺-пДК на всех сроках культивирования (см. рис. 4А–В). Использование 100 или 200 нг/мл Flt3-L значимо не влияло на фенотип B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в культурах. Экспрессия МНС II (I-Ab) на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК свежeweделенного костного мозга оказалась значимо меньше по сравнению с экспрессией данных молекул на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L к 7-м суткам (см. рис. 5), что может говорить о более зрелом фенотипе ДК, полученных в культурах. Однако при стимулировании культур ДК ЛПС или СрG ДНК B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК приобретали еще более зрелый фенотип путем увеличения доли клеток, несущих CD83 и CD86 (см. рис. 5).

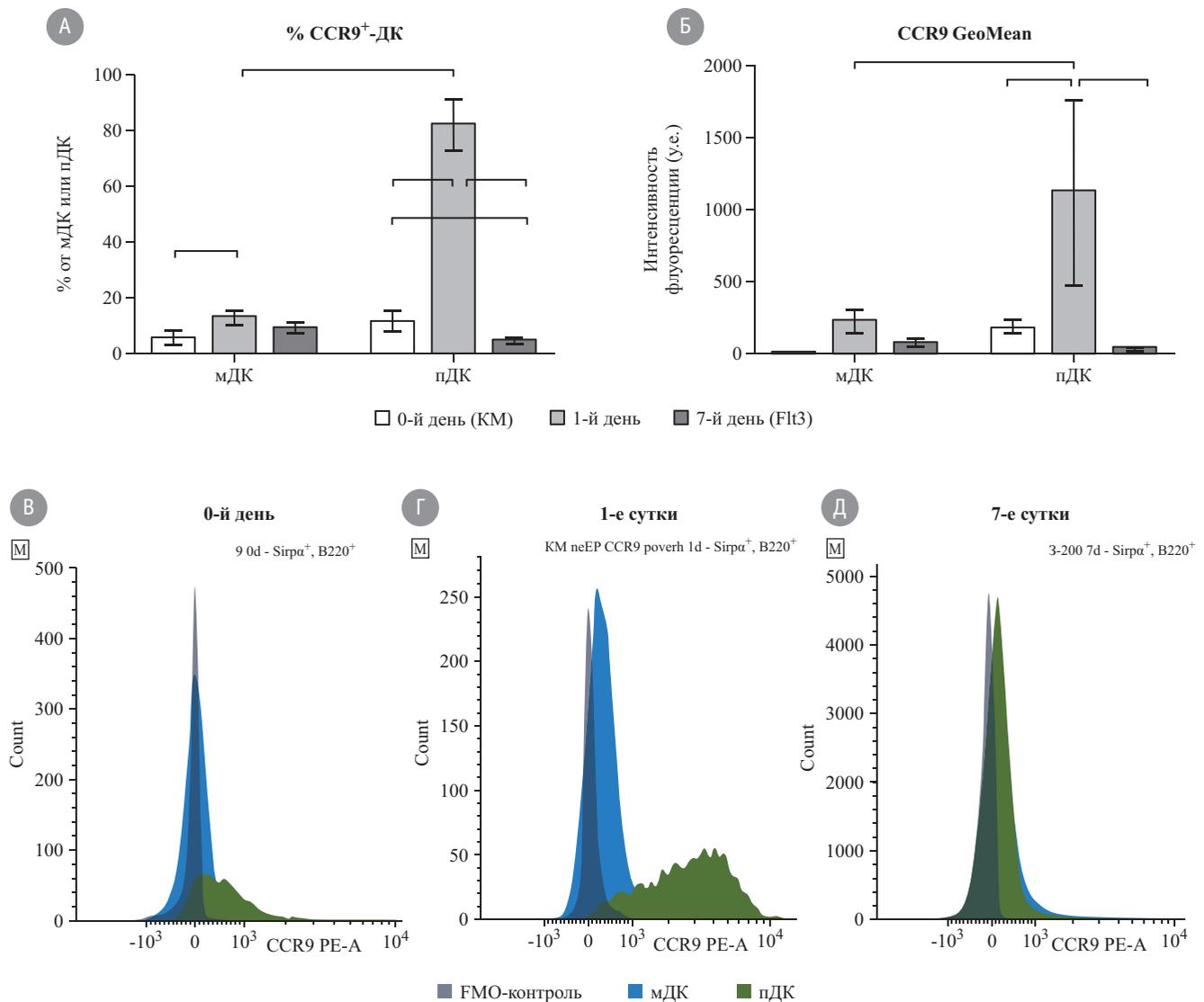


Рис. 7. Относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих поверхностный CCR9 (А) и средняя геометрическая интенсивности флуоресценции поверхностно меченого CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК (Б)

Скобками указаны статистически значимые отличия (сравнения между видами ДК выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Сидака, сравнения между сутками культивирования выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Тьюки; $p \leq 0,05$); В–Д – примеры цитометрии CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на 0, 1, 7-е сутки, соответственно; $n = 6$.

Согласно данным литературы, пДК специализируются на противовирусном иммунном ответе, в большом количестве несут TLR7 и TLR9 и отвечают созреванием на агонист данных рецепторов – CpG ДНК [18], а мДК, несущие преимущественно TLR2 и TLR4, отвечают созреванием на их агонист – ЛПС [19]. Однако в нашем исследовании B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L, созревали под действием как CpG ДНК, так и ЛПС. Но аналогичный ответ на стимуляцию CpG ДНК или ЛПС демонстрировали и B220⁺CD11c⁺-пДК, и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК свежевыделенного костного мозга (см. рис. 5).

Несмотря на более зрелый фенотип по сравнению с ДК костного мозга, ДК, полученные *in vitro* с помощью Flt3-L, вызывали повышенную индукцию CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и сниженную пролиферацию

CD4⁺-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов по сравнению с ДК, стимулированными CpG ДНК (см. рис. 6), что говорило о выполнении полученными ДК функций незрелых ДК [3, 19] и их созревании и приобретении ими иммуногенной функции при стимуляции CpG ДНК.

Интересно, что культуры ДК, стимулированные ЛПС, значимо не отличались в своей способности индуцировать CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и пролиферацию CD4⁺ лимфоцитов от нестимулированных ДК (см. рис. 6), что может говорить о преобладании функциональных свойств пДК в культурах ДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L, несмотря на фенотипические признаки созревания ДК в культурах под действием ЛПС. Также о преобладании плазмацитоидного фенотипа ДК в культурах, полученных с помощью Flt3-L, говорило то, что большое количество Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в таких культурах несли PDCA-1

(см. рис. 4) – специфичный маркер пДК, основной функцией которого является участие в противовирусном иммунном ответе [15, 16]. При этом значимо меньшее количество $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК свежевыделенного костного мозга имели PDCA-1 на своей поверхности по сравнению с $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, полученных с помощью Flt3-L, и по сравнению с $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК свежевыделенного костного мозга (см. рис. 5).

Относительно небольшое количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК свежевыделенного костного мозга и культур, полученных за 7 сут с помощью Flt3-L, имело на своей поверхности относительно невысокий уровень CCR9 (см. рис. 7А–В, Д). Однако было отмечено, что через сутки после экстракции костного мозга в культурах значимо увеличивалось количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, несущих на

своей поверхности CCR9 (см. рис. 7А, Г). В литературе также было показано, что количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК, несущих поверхностный CCR9, увеличивается на 2-е и 3-и сутки в культуре [12]. Возможным объяснением данному явлению служит то, что, являясь рецептором гомеостатического хемокина CCL25, т. е. рецептором, находящимся под постоянным воздействием своего лиганда в организме [21], а также принадлежащим к семейству рецепторов, связанных с G-белками, одним из механизмов регуляции которых является интернализация в клетку после связывания с лигандом [22], CCR9 в клетках организма локализуется преимущественно внутриклеточно [23]. При выделении клеток из организма и потере CCL25-сигналинга CCR9 может выводиться на поверхность клетки. В нашем исследовании также подтвердилась пре-

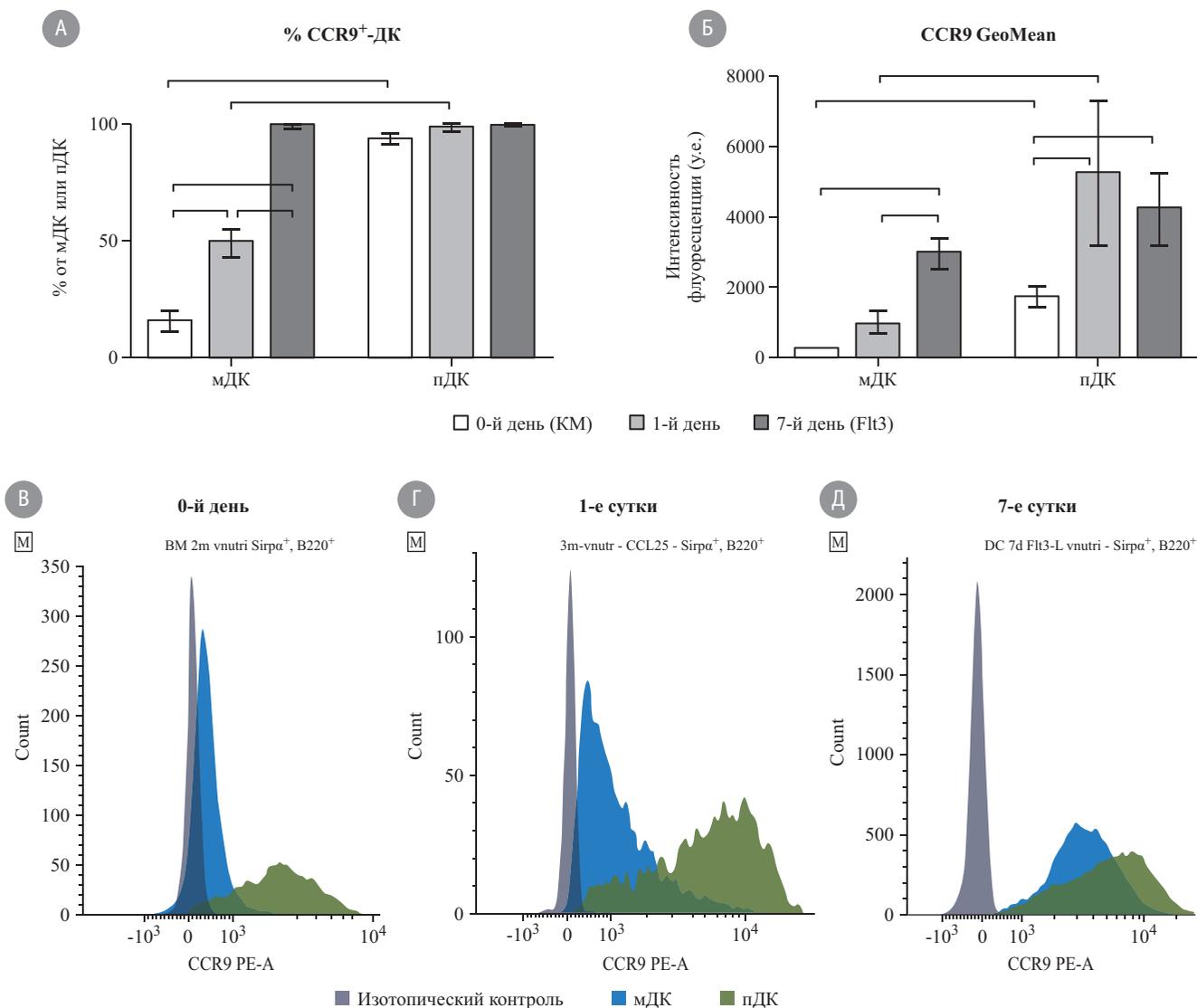


Рис. 8. Относительное количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, несущих внутриклеточный CCR9 (А) и геометрическая средняя интенсивности флуоресценции внутриклеточно меченого CCR9 на $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК (Б)

Скобками указаны статистически значимые отличия (сравнения между видами ДК выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Сидака, сравнения между сутками культивирования выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Тьюки, $p \leq 0,05$). В–Д – примеры цитометрии CCR9 на $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК на 0, 1, 7-е сутки, соответственно; $n = 6$.

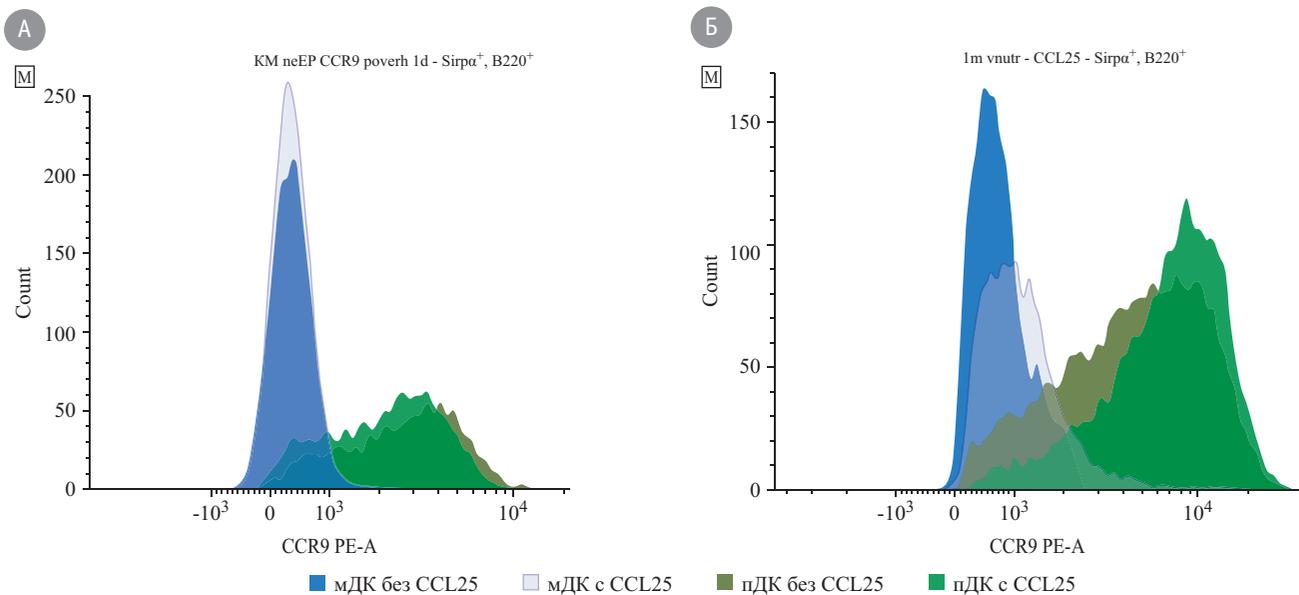


Рис. 9. Примеры цитометрических данных поверхностного (А) и внутриклеточного (Б) окрашивания CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на 1-е сутки культивирования с добавлением или без добавления CCL25

имущественная внутриклеточная локализация CCR9 в B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на всех сроках культивирования (см. рис. 8). Однако добавление к свежывыделенным клеткам костного мозга различных доз CCL25 значимо не влияло на поверхностное и внутриклеточное содержание CCR9 в B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК после первых суток культивирования (см. рис. 9). Также B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L в течение 7 сут без воздействия CCL25, несли CCR9 преимущественно внутриклеточно, а не поверхностно, что может говорить о более сложной регуляции локализации CCR9 в клетке, требующей дальнейшего изучения.

Поскольку интенсивность миграции клеток к источнику CCL25 не коррелирует с количеством клеток, несущих CCR9 на поверхности [17], и не все клетки, мигрировавшие под действием CCL25, несут CCR9 на своей поверхности [23], но в подавляющем большинстве клеток, способных к миграции, обнаруживался высокий уровень внутриклеточного CCR9 [23], то полученные в данном исследовании с помощью Flt3-L B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущие CCR9 преимущественно внутриклеточно, могут быть предложены для изучения их способности к миграции в тимус и индукции центральной иммунной толерантности.

Литература

1. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., Silkov A., Maksyutov A., Sennikov S. cytotoxic activity and memory t cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1017. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.
2. Kulikova E., Kurilin V., Shevchenko J., Obelukhova I., Khrapov E., Boyarskikh U. et al. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumour-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumour cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82 (2): 110–7. DOI: 10.1111/sji.12311.
3. Mansilla M., Sellès-Moreno C., Fàbregas-Puig S., Amoedo J., Navarro-Barriuso J., Teniente-Serra A. et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed

Заключение

Таким образом, с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно получение относительно больших количеств B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. При этом получаемые B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК обладают функциональными свойствами незрелых ДК и высоким внутриклеточным содержанием CCR9, что делает целесообразным дальнейшее изучение их способности к индукции иммунологической толерантности и подавлению нежелательного иммунного ответа. Также при стимуляции ДК, полученных с помощью Flt3-L *in vitro*, CpG ДНК, возможно изменение их функций с толерогенной на иммуногенную для использования данных клеток с целью индукции желаемого адаптивного иммунного ответа.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Сенников С.В., Терещенко В.П. **Сбор и обработка материала:** Терещенко В.П., Булыгин А.С., Заводский Р.Ю., Куликова Е.В. **Статистическая обработка:** Терещенко В.П. **Написание текста:** Терещенко В.П. **Редактирование:** Сенников С.В.

with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* 2015; 21 (3): 222–30. DOI: 10.1111/cns.12342.

4. Ning B., Wei J., Zhang A., Gong W., Fu J., Jia T. et al. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0131152. DOI: 10.1371/journal.pone.0131152.

5. Сенников С., Облехова И. Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека. *Иммунология.* 2016; 37 (5): 291–6. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-291-296

6. Lutz M., Suri R., Niimi M., Ogilvie A., Kukutsch N., Röbner S. et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*

2000; 30 (7): 1813–22. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813::aid-immu1813>3.0.co;2-8.

7. Fujita S., Sato Y., Sato K., Eizumi K., Fukaya T., Kubo M. et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood*. 2007; 110 (10): 3793–803. DOI: 10.1182/blood-2007-04-086470.

8. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R. et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*. 2012; 36 (3): 438–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.017.

9. Hadeiba H., Sato T., Habtezion A., Oderup C., Pan J., Butcher E. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2008; 9 (11): 1253–60. DOI: 10.1038/ni.1658.

10. Mach N., Gillissen S., Wilson S., Sheehan C., Mihm M., Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 2000; 60: 3239–46.

11. Wendland M., Czeloth N., Mach N., Malissen B., Kremmer E., Pabst O. et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (15): 6347–52. DOI: 10.1073/pnas.0609180104.

12. Zeng R., Oderup C., Yuan R., Lee M., Habtezion A., Hadeiba H. et al. Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (4): 847–56. DOI: 10.1038/mi.2012.123.

13. Chen Y., Chang S., Chen T., Lee C. Efficient generation of plasmacytoid dendritic cell from common lymphoid progenitors by Flt3 ligand. *PLoS One.* 2015; 10 (8): e0135217. DOI: 10.1371/journal.pone.0135217.

14. Liu H., Ramachandran I., Gabrilovich D.I. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92 (2): 200–3. DOI: 10.1038/icb.2013.65.

15. Brawand P., Fitzpatrick D. R., Greenfield B., Brasel K., Maliszewski C., De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 2002; 169 (12): 6711–9.

16. Angelov G. S., Tomkowiak M., Marçais A., Leverrier Y., Marvel J. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J. Immunol.* 2005; 175 (1): 189–95.

17. Feng T., Cong Y., Qin H., Benveniste E., Elson C. Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J. Immunol.* 2010; 185 (10): 5915–25. DOI: 10.4049/jimmunol.1001233.

18. Karrich J., Jachimowski L., Uittenbogaart C., Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J. Immunol.* 2014; 193 (12): 5772–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1401541.

19. Funderburg N., Lederman M., Feng Z., Drage M., Jadlowsky J., Harding C. et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (47): 18 631–5.

20. Bhattacharya P., Gopisetty A., Ganesh B., Sheng J., Prabhakar B. GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 89: 235–49.

21. Muller G., Hopken U., Stein H., Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72 (1): 1–8.

22. Syrovatkin V., Alegre K., Dey R., Huang X. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J. Mol. Biol.* 2016; 428 (19): 3850–68. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.002

23. Lee H., Kim H., Lee E., Jang M., Kim S., Park J. et al. Characterization of CCR9 expression and thymus-expressed chemokine responsiveness of the murine thymus, spleen and mesenteric lymph node. *Immunobiology.* 2012; 217 (4): 402–11. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.10.014.

References

1. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., Silkov A., Maksyutov A., Sennikov S. cytotoxic activity and memory t cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1017. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.

2. Kulikova E., Kurilin V., Shevchenko J., Obleukhova I., Khrapov E., Boyarskikh U., et al. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumour-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumour cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82 (2): 110–7. DOI: 10.1111/sji.12311.

3. Mansilla M., Sellès-Moreno C., Fàbregas-Puig S., Amoedo J., Navarro-Barriuso J., Teniente-Serra A., et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* 2015; 21 (3): 222–30. DOI: 10.1111/cns.12342.

4. Ning B., Wei J., Zhang A., Gong W., Fu J., Jia T., et al. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0131152. DOI: 10.1371/journal.pone.0131152.

5. Sennikov S., Obleukhova I. Methods of induction of tolerant dendritic cells in animals and humans. *Immunologiya.* 2016; 37 (5): 291–6. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-291-296. (in Russian)

6. Lutz M., Suri R., Niimi M., Ogilvie A., Kukutsch N., Röbner S., et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30 (7): 1813–22. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813::aid-immu1813>3.0.co;2-8.

7. Fujita S., Sato Y., Sato K., Eizumi K., Fukaya T., Kubo M., et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood.* 2007; 110 (10): 3793–803. DOI: 10.1182/blood-2007-04-086470.

8. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R., et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity.* 2012; 36 (3): 438–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.017.

9. Hadeiba H., Sato T., Habtezion A., Oderup C., Pan J., Butcher E. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2008; 9 (11): 1253–60. DOI: 10.1038/ni.1658.

10. Mach N., Gillissen S., Wilson S., Sheehan C., Mihm M., Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 2000; 60: 3239–46.

11. Wendland M., Czeloth N., Mach N., Malissen B., Kremmer E., Pabst O., et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (15): 6347–52. DOI: 10.1073/pnas.0609180104.

12. Zeng R., Oderup C., Yuan R., Lee M., Habtezion A., Hadeiba H., et al. Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (4): 847–56. DOI: 10.1038/mi.2012.123.

13. Chen Y., Chang S., Chen T., Lee C. Efficient generation of plasmacytoid dendritic cell from common lymphoid progenitors by Flt3 ligand. *PLoS One.* 2015; 10 (8): e0135217. DOI: 10.1371/journal.pone.0135217.

14. Liu H., Ramachandran I., Gabrilovich D.I. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92 (2): 200–3. DOI: 10.1038/icb.2013.65.

15. Brawand P., Fitzpatrick D. R., Greenfield B., Brasel K., Maliszewski C., De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 2002; 169 (12): 6711–9.

16. Angelov G. S., Tomkowiak M., Marçais A., Leverrier Y., Marvel J. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J. Immunol.* 2005; 175 (1): 189–95.

17. Feng T., Cong Y., Qin H., Benveniste E., Elson C. Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J. Immunol.* 2010; 185 (10): 5915–25. DOI: 10.4049/jimmunol.1001233.

18. Karrich J., Jachimowski L., Uittenbogaart C., Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J. Immunol.* 2014; 193 (12): 5772–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1401541.

19. Funderburg N., Lederman M., Feng Z., Drage M., Jadlowsky J., Harding C., et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (47): 18 631–5.

20. Bhattacharya P., Gopisetty A., Ganesh B., Sheng J., Prabhakar B. GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 89: 235–49.

21. Muller G., Hopken U., Stein H., Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72 (1): 1–8.

22. Syrovatkin V., Alegre K., Dey R., Huang X. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J. Mol. Biol.* 2016; 428 (19): 3850–68. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.002

23. Lee H., Kim H., Lee E., Jang M., Kim S., Park J., et al. Characterization of CCR9 expression and thymus-expressed chemokine responsiveness of the murine thymus, spleen and mesenteric lymph node. *Immunobiology.* 2012; 217 (4): 402–11. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.10.014.

© Коллектив авторов, 2020

Безрукова Е.В.¹, Воробейчиков Е.В.², Конусова В.Г.², Пашинин А.Н.¹, Симбирцев А.С.³

Оценка изменений концентраций цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra в назальных секретах больных острым гнойным риносинуситом на фоне иммунокорректирующей терапии β -D-глюканами

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 190013, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «Полифарм», 197101, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, 197110, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме

Введение. Стандартные методы и препараты для лечения острого гнойного риносинусита (ОГРС) не обладают иммуномодулирующей активностью, что не способствует развитию быстрой динамики завершения воспалительного процесса и купирования основных симптомов заболевания. β -D-глюканы грибного происхождения обладают противовоспалительной и иммуномодулирующей активностью. Однако применение этих биополимеров для лечения ОГРС изучено недостаточно.

Цель работы – оценка распределения концентраций функциональной пары цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β в назальных секретах пациентов с ОГРС на фоне применения антибиотиков в сочетании с β -D-глюканами.

Материал и методы. Пациенты были распределены на четыре группы. 1-я группа состояла из 32 практически здоровых людей, 2-я группа – из 24 пациентов с ОГРС до лечения, 3-я группа – из 22 пациентов с ОГРС, которые получали стандартную терапию, включающую внутримышечное введение антибиотика и пункции верхнечелюстных пазух, 4-я группа – из 24 пациентов, которые наряду со стандартной терапией получали β -D-глюканы. Общая продолжительность терапии – 10 дней. Определение концентрации ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β проводили в назальных секретах методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Установлено, что качественная визуальная оценка смещения проекции концентраций указанных цитокинов демонстрирует их позитивные изменения, так как к 10-му дню лечения в группе пациентов, получавших комбинированную терапию, область проекции их концентраций приближается к области проекции цитокинов группы здоровых людей. Стандартная терапия такого эффекта не дает, так как оказывает минимальное влияние на локальные изменения концентраций этих цитокинов.

Заключение. Дополнение стандартной схемы лечения ОГРС препаратом, содержащим иммуномодулирующий компонент – β -D-глюканы, является целесообразным.

Ключевые слова: β -D-глюканы; острый риносинусит; цитокины; ИЛ-1 β ; ИЛ-1Ra; иммунокорректирующая терапия

Статья поступила 20.03.2020. Принята к публикации 16.04.2020.

Для цитирования: Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Пашинин А.Н., Симбирцев А.С. Оценка изменений концентраций цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra в назальных секретах больных острым гнойным риносинуситом на фоне иммунокорректирующей терапии β -D-глюканами. Иммунология. 2020, 41 (3): 227–234. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-227-234

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Безрукова Евгения Валерьевна –
кандидат медицинских наук,
доцент, ФГБОУ ВО
«СЗГМУ имени И.И. Мечникова»
Минздрава России, Санкт-Петербург,
Российская Федерация
E-mail: ban_@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9941-7006>

Bezrukova E.V.¹, Vorobeychikov E.V.², Konusova V.G.², Paschinin A.N.¹, Simbirtsev A.S.³

Evaluation of cytokines IL-1 β and IL-1Ra concentration in nasal secretion in patients with acute purulent rhinosinusitis during immune therapy of β -D-glucans

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 190013, St. Petersburg, Russian Federation

² Limited Liability Company «Polifarm», 197101, St. Petersburg, Russian Federation

³ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, 197110, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract

Introduction. Standard methods and medicines for treatment of acute purulent rhinosinusitis (APRS) do not possess immunomodulating activity that does not promote development of fast dynamics of the end of inflammatory process and knocking over of the basic symptoms of disease. The β -D-glucans mushrooms origin have anti-inflammatory and immunomodulating activity. However, application of these biopolymers for treatment APRS is studied insufficiently.

The aim of the study – an assessment of a distribution of functional pair of cytokines IL-1Ra and IL-1 β concentrations in nasal secrets in patients with APRS against application of antibiotics in a combination with β -D-glucans.

Material and methods. Patients have been divided into 4 independent groups. Group 1 consisted of 32 healthy ones. Group 2 consisted of 24 patients with APRS before treatment. Group 3 consisted of 22 patients with APRS who received standard therapy, including antibacterial drugs and puncture of the maxillary sinuses. Group 4 consisted of 24 patients who received β -D-glucans along with standard therapy. The total duration of therapy was 10 days. IL-1Ra and IL-1 β concentrations in nasal secrets were defined by enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.

Results. It is positioned that the qualitative visual estimation of shift of a projection of specified cytokines concentrations shows positive changes since by 10 day of treatment in group of the patients received combined therapy, the area of a projection of its concentration comes nearer to cytokines projection area in healthy people. Standard therapy does not lead to such effect, since the minimal impact on local changes of these cytokines levels.

Conclusion. Addition of a medicine containing immunomodulating component β -D-glucans to the APRS standard treatment is reasonable.

Keywords: β -D-glucans; acute rhinosinusitis; cytokines; IL-1 β ; IL-1Ra; immune correction therapy

Received 20.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Paschinin A.N., Simbirtsev A.S. Evaluation of cytokines IL-1 β and IL-1Ra concentrations in nasal secretion in patients with acute purulent rhinosinusitis during immune therapy of β -D-glucans. *Immunologiya*. 2020, 41 (3): 227–34. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-227-234 (in Russian)

Funding. The study had not sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Eugenia V. Bezrukova –
PhD, Docent,
North-Western State
Medical University
named after I.I. Mechnikov,
Ministry of Healthcare
of Russian Federation,
St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: ban_@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0001-9941-7006>

Введение

Острый гнойный риносинусит (ОГРС) представляет собой воспаление слизистой оболочки носа и околоносовых пазух и сопровождается затруднением носового дыхания, слизисто-гнойными выделениями из носа, болями в области околоносовых пазух, нарушением обоняния [1, 2]. Воздействие возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) на слизистую оболочку верхних дыхательных путей (ВДП) вызывает нарушение ее барьерной функции, что активирует раз-

личные компоненты мукозального иммунитета (рецепторы врожденного иммунитета, антимикробные пептиды, систему комплемента, цитокины, дендритные клетки и т. д.) и проявляется развитием локального воспалительного процесса. Однако естественная активация иммунных реакций может оказаться недостаточной, что приведет к снижению адекватного иммунного ответа и элиминации патогена. Индуцированная активация иммунитета в сочетании со средствами симптоматической или этиотропной направленности может усиливать про-

цессы выведения антигена из организма и репарацию слизистой оболочки ВДП. Однако стандартные методы и препараты для лечения ОГРС не обладают иммуномодулирующей активностью, что не способствует быстрой динамике завершения воспалительного процесса и купированию основных симптомов заболевания.

Стандартные способы лечения ОГРС базируются на применении антибактериальных препаратов, интраназальных глюкокортикостероидов, муколитических средств и ирригационной терапии [1–4]. Однако применение антибиотиков неэффективно при инфицировании вирусами, которые являются основной причиной развития острых или обострений хронических заболеваний ВДП [5]. Локальное использование глюкокортикостероидов ограничено наличием гнойного экссудата в околоносовых пазухах пациентов [6]. Муколитические средства не оказывают влияния на патогенетические механизмы воспаления и применяются в качестве вспомогательной секретолитической терапии [7, 8]. Ирригационные способы лечения ОГРС на основе пункций верхнечелюстных пазух имеют ограничения, связанные с возможными осложнениями (кровотечения, эмболия, аллергические реакции на анестетики, последствия неправильного проведения манипуляции, выраженный дискомфорт у пациентов и т. д.) [9].

Поэтому все чаще в дополнение к стандартным схемам лечения ОГРС используют иммуномодулирующие препараты, например препараты на основе бактериальных пептидогликанов, а также лизаты клеточных стенок или рибосом микроорганизмов – частых возбудителей заболеваний ВДП (Ликопид®, Имудон®, Бронхомунал®, ИРС 19® и т. д.) [10]. Действие таких средств основано на активации генетически детерминированных рецепторов врожденного иммунитета (TLR, NLR, RLR, CTLR) консервативными структурными компонентами клеточных стенок различных патогенов (pathogen-associated molecular patterns – PAMP) [11, 12]. Включение препаратов микробного происхождения в лечение заболеваний ВДП сокращает длительность воспалительного процесса и уменьшает выраженность симптомов [13–16].

В последние годы активно исследуется фармакологический потенциал β -D-глюканов – структурообразующих полисахаридов клеточных стенок грибов и дрожжей [17, 18]. Этот вид PAMP является маркером не только патогенных видов грибов, но и высших базидиальных, употребляемых в пищу. В странах Юго-Восточного региона высшие виды грибов традиционно в течение многих веков используют для лечения опухолей, диабета, аллергий [19]. В настоящее время выделяемые из пищевых грибов β -D-глюканы отнесены в группу модификаторов биологических реакций и в ряде стран используются для лечения опухолей, профилактики сезонных простудных заболеваний вирусной и бактериальной природы [20, 21]. При моделировании на животных воспалительных процессов в легких и кишечнике было показано, что грибные полисахариды обладают выраженным противовоспалительным действием [22, 23]. В других исследованиях установлена кли-

ническая эффективность применения β -D-глюканов в лечении воспалительных заболеваний ВДП [24–26]. Вместе с тем механизм действия полисахаридов грибов до конца не изучен и требует детализации.

Ранее нами было показано, что проекции распределения концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β в назальных секретах пациентов при различных формах хронического полипозного процесса достоверно отличаются как от соответствующих показателей у практически здоровых доноров, так и между собой [27]. С одной стороны, такой подход к оценке противовоспалительных и провоспалительных цитокинов позволяет решать диагностические задачи, например, связанные с дифференцированием различных форм течения полипозного процесса – полипозно-гнойного риносинусита и его сочетания с бронхиальной астмой. С другой стороны, величину соотношения концентраций этой функциональной пары цитокинов в виде ИЛ-1Ra/ИЛ-1 β можно использовать в качестве индикатора тяжести патологического процесса и эффективности лечения [27, 28]. Однако неизвестно влияние β -D-глюканов грибов на концентрации этих цитокинов в назальных секретах пациентов при острых воспалительных заболеваниях ВДП, что не позволяет определить целесообразность их применения в качестве патогенетических средств иммунокорректирующей терапии.

Целью исследования стала оценка распределения концентраций функциональной пары цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β в назальных секретах пациентов с ОГРС на фоне применения антибиотиков в сочетании с β -D-глюканами грибного происхождения.

Материал и методы

В исследование включали пациентов с ОГРС, находившихся на лечении в клинике оториноларингологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ имени И.И. Мечникова» Минздрава России. Возраст пациентов – от 18 до 55 лет, количество мужчин и женщин было практически одинаковым.

Пациенты предъявляли жалобы на боли в проекции верхнечелюстной пазухи, головные боли, гнойные выделения из носа. На рентгенограммах в 43 % случаев выявлялось изолированное затемнение обеих верхнечелюстных пазух; в 52 % – поражение верхнечелюстных пазух и клеток решетчатого лабиринта; в 25 % – поражение лобной пазухи, верхнечелюстной и клеток решетчатого лабиринта; в 8 % – гемисинусит; в 5 % – поражение всех околоносовых пазух. При пункции верхнечелюстных пазух в 84 % случаев было получено гнойное отделяемое, в остальных случаях – слизисто-гнойное отделяемое. Продолжительность болезни – не менее 10 дней, но не превышала 3–4 нед.

В исследовании приняли участие 102 пациента, которые были распределены в четыре независимые группы. 1-ю группу составили 32 практически здоровых донора, 2-ю – 24 пациента с ОГРС до лечения, 3-ю – 22 пациента с ОГРС, которые получали традиционную терапию, включающую антибактериальные препараты

и пункции верхнечелюстных пазух; 4-я группа состояла из 24 пациентов, которые наряду с традиционной терапией получали иммуномодулирующее средство. Исследование проводили согласно Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике.

Секрет из носа брали с помощью стерильной поролоновой турунды, вводимой в полость носа на 15–20 мин. Затем турунду помещали в пробирку и центрифугировали 15 мин со скоростью 1000 об/мин. Полученный носовой секрет замораживали до $-18,0^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего определения концентраций цитокинов ИЛ-1Ra, и ИЛ-1 β (пг/мл). Концентрацию цитокинов определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа с применением тест-систем производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург).

Стандартная терапия включала антибактериальный препарат цефтриаксон 1,0 в/м 1 раз в сутки и пункции верхнечелюстных пазух. Комбинированная терапия состояла из внутримышечного введения указанного антибиотика и перорального применения иммуномодулирующего средства Глюкаферон® (Санкт-Петербург) [29, 30]. Общая продолжительность лечения составляла 10 дней. Иммуномодулирующее средство является комбинацией β -D-глюкана, выделенного из пищевого гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) и антиоксидантного комплекса, включающего рутин, бромелаин и янтарную кислоту. Согласно современным международным требованиям безопасности к пищевым продуктам и лекарственным препаратам биополимеры грибов – β -D-глюканы – относятся к группе токсикологически безопасных соединений [класс «generally recognized as safe» по классификации Food and Drug Administration (FDA), США, 2001].

Анализ результатов исследования проводили с помощью методов описательной, параметрической и непараметрической статистики [31, 32]. Для определения

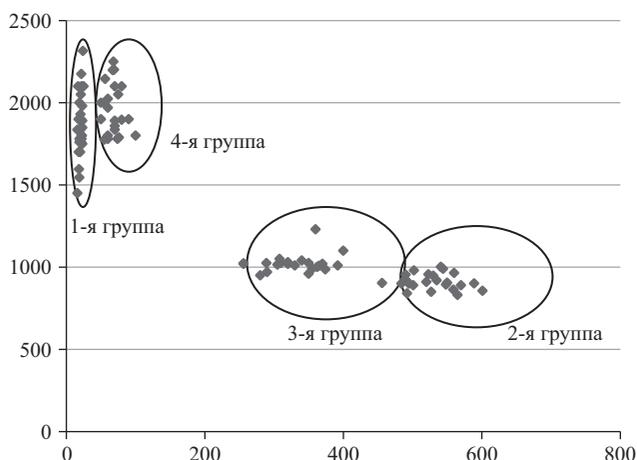


Рис. 1. Распределение групп пациентов в проекции концентраций функциональной пары цитокинов

По оси абсцисс – ИЛ-1 β , пг/мл; по оси ординат – ИЛ-1Ra, пг/мл.

статистической достоверности различий значений концентраций цитокинов использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок и непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни. Вероятность $p < 0,05$ оценивали как достаточную для вывода о наличии статистически достоверных различий данных, полученных в процессе исследования.

Результаты

На рис. 1 показано распределение пациентов 1–4-й групп в проекции концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β . Распределение пациентов демонстрирует, что 1-я группа (практически здоровые доноры) расположена на достаточно удаленном расстоянии от 2-й группы пациентов, что позволяет дифференцировать эти группы между собой. Анализ концентраций провоспалительного цитокина ИЛ-1 β демонстрирует, что при развитии ОГРС (2-я группа) происходит значительное увеличение его значений, которые находятся в интервале 450,0–600,0 пг/мл. При этом отмечается снижение концентрации ИЛ-1Ra, значения которой находятся в интервале 750,0–1000,0 пг/мл.

На фоне традиционной терапии (3-я группа) наблюдается незначительный сдвиг проекции концентраций цитокинов относительно 2-й группы пациентов. Так, интервал концентраций цитокина ИЛ-1 β составил 250,0–400,0 пг/мл, а интервал концентраций рецепторного антагониста – от 980,0–1250,0 пг/мл. Незначительное смещение проекции концентраций этой пары цитокинов у пациентов 3-й группы также позволяет дифференцировать эту группу пациентов от 2-й группы пациентов. Однако незначительное смещение проекции концентраций этой пары цитокинов указывает на минимальный эффект влияния традиционного лечения ОГРС на изменение концентраций про- и противовоспалительных цитокинов и механизмы цитокиновой регуляции воспаления соответственно.

На фоне применения методов традиционной терапии в сочетании с иммуномодулирующим средством в 4-й группе отмечается более выраженное смещение проекции концентраций цитокинов у этих пациентов относительно 2 и 3-й групп. Так, концентрации ИЛ-1 β находятся в интервале 50,0–90,0 пг/мл, а концентрации рецепторного антагониста – 1700,0–2300,0 пг/мл. С одной стороны, полученный эффект смещения проекции концентраций функциональной пары цитокинов пациентов 4-й группы свидетельствует о значимом влиянии иммуномодулирующего средства на уровни концентраций этой пары цитокинов. С другой стороны, интервал проекции концентраций цитокинов этой группы пациентов приближается к области проекции концентраций цитокинов в группе практически здоровых доноров (1-й), что демонстрирует целесообразность применения β -D-глюканов для позитивного изменения направленности локального воспалительного процесса.

В табл. 1 представлена статистическая достоверность различий средних значений концентраций цито-

Таблица 1. Достоверность различий средних значений концентраций цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra между 1-й и 4-й группами пациентов

Цитокины, пг/мл, <i>M ± Sd</i>	Группа		Значения <i>t</i> -критерия Стьюдента <i>t</i> ; <i>t</i> _{кр.}	Значения <i>U</i> -критерия Манна–Уитни <i>U</i> ; <i>Z</i>
	1-я	4-я		
ИЛ-1 β	20,52 ± 2,29	67,5 ± 12,36	18,38; 2,02; <i>p</i> < 0,01	0,00; -6,36; <i>p</i> < 0,01
ИЛ-1Ra	1863,50 ± 180,51	1960,17 ± 148,89	-2,19; 2,01; <i>p</i> < 0,05	257,5; -2,09; <i>p</i> < 0,05

кинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β между 1-й группой (практически здоровые доноры) и 4-й группой, в которой пациенты получали традиционное лечение в сочетании с иммуномодулирующим средством. Расчеты, проведенные на основе параметрического и непараметрического критериев, демонстрируют статистическую достоверность различий концентраций исследуемых цитокинов (*p* < 0,01, *p* < 0,05 соответственно). Это означает, что, по сравнению со 2-й и 3-й группами пациентов 10-дневный курс традиционной терапии и иммуномодулирующего средства приближает значения концентрации цитокинов к группе практически здоровых доноров, что подтверждает направленность позитивного эффекта комбинированного лечения. Однако статистические различия концентраций цитокинов 1 и 4-й групп показывают, что для достижения концентраций цитокинов, наблюдаемых у здоровых доноров, 10-дневного курса комбинированной терапии недостаточно.

На рис. 2 представлены значения соотношения концентраций функциональной пары цитокинов в виде ИЛ-1Ra/ИЛ-1 β у исследуемых групп пациентов. В группе практически здоровых доноров (1-я) соотношение концентраций цитокинов показывает значительное преобладание ИЛ-1Ra над ИЛ-1 β . При ОГРС (2-я группа) соотношение концентраций цитокинов снижается до минимальных значений. Это происходит за счет увеличения концентрации провоспалительного цитокина и снижения концентрации противовоспалительного цитокина, что характерно для развития острого воспалительного процесса.

Стандартная терапия (3-я группа) практически не меняет этого соотношения, что означает отсутствие тенденции к уменьшению выраженности и завершенности воспалительного процесса на уровне цитокиновой регуляции. Однако при сочетании стандартной терапии с иммуномодулирующим средством (4-я группа) наблюдается отчетливая тенденция к повышению соотношения концентраций цитокинов, направленная к уровню практически здоровых доноров (1-я группа). Этот эффект связан с увеличением концентрации противовоспалительного цитокина и уменьшением концентрации провоспалительного цитокина.

В табл. 2 представлена статистическая достоверность различий значений соотношения концентраций цитокинов ИЛ-1Ra/ИЛ-1 β у практически здоровых доноров (1-я группа) и пациентов после применения традиционной терапии в сочетании с иммуностимулирующим средством (4-я группа). Согласно расчетам, что средние значения этого показателя статистически

различны между собой (*p* < 0,05). Это свидетельствует о целесообразности его применения в качестве потенциального индикатора эффективности лечения.

Обсуждение

В работе показано, что для определения влияния стандартной терапии и иммуномодулирующего средства на развитие ОГРС могут использоваться оценки проекций распределений концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β в четырех независимых группах. Установлено, что даже качественная визуальная оценка смещения проекции концентраций функционально сопряженной пары цитокинов демонстрирует их позитивные изменения, так как к 10-му дню лечения только в группе пациентов, получавших комбинированную терапию, область проекции концентраций цитокинов приближается к области проекции концентраций цитокинов, наблюдаемой в группе здоровых доноров. В ранее проведенных исследованиях было показано, что клинических признаков ОГРС (затруднение носового дыхания, интенсивность выделений из носа, изменение характера пунктата из верхнечелюстных пазух, состояние слизистой оболочки носа) в этой группе пациентов также не наблюдали [26]. Лечение пациентов по стандартной схеме, состоящей из антибиотиков и пункций верхнечелюстных пазух, к 10-му дню не обеспечивало полного купирования указанных клинических признаков воспалительного процесса.

Однако для более детальной оценки устойчивости и динамики сдвига проекции концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β логично применение схемы исследования, когда проекции этих параметров регистрируются у одного и того же пациента в различные сроки лечения. В этом случае повышается информативность изменений проекций распределения концентраций цитокинов у конкретного пациента за счет построения траектории его положения относительно пространства concentra-

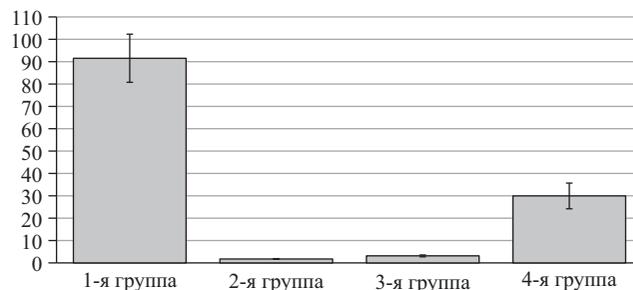


Рис. 2. Соотношения концентраций цитокинов ИЛ-1Ra/ИЛ-1 β в различных группах исследования

Таблица 2. Достоверность различий значений соотношения концентраций цитокинов ИЛ-1Ra/ИЛ-1β в 1 и 4-й группах

Группа		t-критерий Стьюдента	U-критерий Манна–Уитни
1-я	4-я		
$M \pm Sd$	$M \pm Sd$	$t, t_{кр.}$	$U; Z$
91,09 ± 10,64	29,96 ± 5,74	27,26; 2,02; $p < 0,05$	0,00; -6,31; $p < 0,01$

ций указанной пары цитокинов за время лечения (Δt). Дальнейшее развитие такого подхода представляется актуальным для оптимизации персонализированной иммунотерапии как острых, так и хронических форм инфекционно-воспалительных заболеваний ВДП. Примененный диагностический подход, основанный на определении соотношения концентраций двух взаимозависимых цитокинов ИЛ-1Ra/ИЛ-1β, по нашему мнению, также является информативным, так как минимизирует индивидуальные особенности продукции цитокинов на фоне воспалительного процесса и уточняет тенденции его развития.

Полученные результаты показали, что дополнение стандартной терапии ОГРС иммуномодулирующим средством, в состав которого входят β-D-глюканы, повышает эффективность лечения. Важно, что β-D-глюканы грибов эффективны при пероральном использовании [23]. Однако механизм действия этих природных биополимеров до конца не изучен. Известно, что в отличие от α-глюканов и других РАМР бактериального происхождения, имеющих в своем составе белки, β-D-глюканы не перевариваются в желудочно-кишечном тракте. Поэтому β-D-глюканы активно взаимодействуют со специфическими рецепторами (Dectin-1), локализованными на миелоцитах (моноцитах, макрофагах, дендритных клетках), а также на эпителиоцитах слизистых, выстилающих желудочно-кишечный тракт [17]. Связывание Dectin-1-рецепторов активирует процессы врожденного иммунитета: фагоцитоз, сопровождающийся повышением продукции активных форм кислорода, формирование инфламмосомы, запускающей продукцию провоспалительных цитокинов, и т. д. [18].

Вместе с тем имеются сомнения относительно такого механизма активации врожденного иммунитета β-D-глюканами, так как большая молекулярная масса этих веществ (> 500 кДа) представляет трудности для их взаимодействия с клетками. Ряд исследователей предполагает, что макрофаги, захватывая β-D-глюканы, переваривают их и затем передают короткие фрагменты другим клеткам врожденного иммунитета: моноцитам,

нейтрофилам, естественным киллерам, несущим на своей поверхности другую группу специфических рецепторов полисахаридов – CR3 [33].

Существует еще целый ряд нерешенных вопросов относительно механизма действия β-D-глюканов. В частности, не всегда объясним широкий спектр вызываемых этими биополимерами эффектов. Однако показано, что они обладают противоопухолевым, противовоспалительным, иммуномодулирующим, противовирусным и антимикробным действием, а также гипогликемическим, гиполипидемическим, противобольным и противоотечным эффектами [17]. Возможно, этот феномен объясняется тем, что формирование ответа организма на β-D-глюканы в процессе филогенеза оказалось связанным с древними и жизненно важными механизмами регуляции гомеостаза [19].

Выводы

1. Одновременное определение в назальных секретах пациентов при различных патологических состояниях уровней двух функционально связанных цитокинов, относящихся к семейству ИЛ-1 – провоспалительного цитокина ИЛ-1β и антагониста его рецептора ИЛ-1Ra – методически более правильное, так как отношение этих двух показателей позволяет исключить индивидуальные особенности продукции цитокинов и уточнить тенденции развития воспаления.

2. Включение в стандартную схему лечения ОГРС препарата, в композицию которого входят β-D-глюканы, выделенные из пищевых грибов вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*), обладающие иммуномодулирующим действием, приводит к нормализации местной продукции цитокинов семейства ИЛ-1 в течение 10-дневного курса перорального приема.

3. Установленный незначительный сдвиг смещения проекции концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1β демонстрирует минимальный эффект влияния стандартной терапии ОГРС на локальные изменения концентраций этих цитокинов и на механизмы цитокиновой регуляции воспалительного процесса.

Литература

1. Острый риносинусит: клинические рекомендации. А.С. Лопатин (ред.). Москва: Российское общество ринологов, 2017. 36 с.

2. Кривопапов А.А. Риносинусит: классификация, эпидемиология, этиология и лечение. Медицинский совет. 2016; 6: 22–5.

3. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H.,

Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y., Wormald P.J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012; 50 (1): 1–12.

4. Овчинников А.Ю., Эдже М.А., Хон Е.М., Коростелев С.А. Острый риносинусит: основные заблуждения и возможности стандартизированной фитотерапии. Медицинский совет. 2016; 6: 28–31.

5. Рязанцев С.В., Кривопапов А.А., Еремин С.А., Захарова Г.П., Шабалин В.В., Шамкина П.А., Чуфистова А.В. Топическая антибактериальная терапия острого риносинусита. *РМЖ*. 2020; 28 (4).

6. Косяков С.Я., Миавнина Ю.В. Место топической стероидной терапии в лечении острого риносинусита. Медицинский совет. 2017; 16: 18–23.

7. Принципы этиопатогенетической терапии острых риносинуситов: метод. рекомендации. С.В. Рязанцев (ред.). Санкт-Петербург : Полифорум Групп, 2015: 40 с.

8. Карпищенко С.А., Лавренова Г.В., Шахназаров А.Э. и др. Острые и хронические риносинуситы: дополнительные возможности консервативной терапии. Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae. 2018; 24 (4): 62–8.

9. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Овчинников А.Ю. и др. Возможности беспункционного лечения гнойных гайморитов. Российская оториноларингология. 2004; 3 (10): 150–2.

10. Справочник Видаль 2020. Лекарственные препараты в России. Видаль Рус, 2020: 1118 с. ISBN:978-5-9500273-9-0.

11. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat. Immunol. 2015; 16 (4): 343–53. DOI: 10.1038/ni.3123.

12. Hannoodee S., Nasuruddin D.N. Acute Inflammatory Response. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310543>.

13. Koatz A.M., Coe N.A., Cicerán A., Alter A.J. Clinical and immunological benefits of OM-85 bacterial lysate in patients with allergic rhinitis, asthma, and COPD and recurrent respiratory infections. Lung. 2016; 194 (4): 687–97. DOI: 10.1007/s00408-016-9880-5.

14. Esposito S., Bianchini S., Bosis S., Tagliabue C., Coro I., Argentiero A., Principi N. A randomized, placebo-controlled, double-blinded, single-centre, phase IV trial to assess the efficacy and safety of OM-85 in children suffering from recurrent respiratory tract infections. J. Transl. Med. 2019; 17 (1): 284. DOI: 10.1186/s12967-019-2040-y.

15. Esposito S., Bianchini S., Polinori I., Principi N. Impact of OM-85 given during two consecutive years to children with a history of recurrent respiratory tract infections: a retrospective study. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2019; 16 (6): E1065. DOI: 10.3390/ijerph16061065.

16. Yin M., Zhang Y., Li H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. Front. Immunol. 2019; 10: 145. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00145.

17. Friedman M. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. Foods. 2016; 5 (4): 80.

18. Camilli G., Tabouret G., Quintin J. The complexity of fungal β -glucan in health and disease: effects on the mononuclear phagocyte system. Molecules. 2016; 21 (7): 938.

19. Bashir K.M., Choi J.S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18 (9): 84–102.

20. Jesenak M., Urbancikova I., Banovcin P. Respiratory tract infections and the role of biologically active polysaccharides in their management and prevention. Nutrients. 2017; 9 (7): 779.

21. Elsayed A., Enshasy H. et al. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Mediators Inflamm. 2014; 10 (1): 55–81.

22. Vetvicka V., Vetvickova J. Glucan supplementation enhances the immune response against an influenza challenge in mice. Ann. Transl. Med. 2015; 22 (2): 2305.

23. Muszyńska B., Grzywacz-Kisielewska A., Kała K., Gdula-Argasińska J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: a review. Food Chem. 2018; 243: 373–81.

24. Leentjens J., Quintin J., Gerretsen J. et al. The effects of orally administered beta-glucan on innate immune responses in humans, a randomized open-label intervention pilot-study. PLoS One. 2014; 9 (9): e108794.

25. Minov J., Bislimovska-Karadzinska J. et al. Effects of pleuran (B-glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation on incidence and duration of COPD exacerbations. J. Med. Sci. 2017; 5 (7): 893–8.

26. Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г. Повышение эффективности антибактериальной терапии острого гнойного риносинусита. Российская оториноларингология. 2013; 3 (64): 10–16.

27. Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Курцер Г.М., Симбирцев А.С. Исследование зависимости изменений концентраций цитокинов ИЛ-1Ra и ИЛ-1 β в носовых секретах пациентов от применения иммунокорректирующих препаратов при хроническом полипозном риносинусите. Иммунология. 2019; 40 (5): 5–10.

28. Безрукова Е.В., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Симбирцев А.С. Оценка тяжести хронического полипозного риносинусита на основе изменений концентраций цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-1Ra в носовых секретах. Медицинская иммунология. 2019; 21 (6): 1155–62.

29. Патент РФ № 2450812, 20122450812 «Средство для лечения инфекционных заболеваний дыхательного тракта «Глюкаферон», 2012.

30. Шамцян М.М., Воробейчиков Е.В., Конусова В.Г., Симбирцев А.С. Иммуномодулирующие свойства высших базидиальных грибов. Цитокины и воспаление. 2012; 11 (1): 26–37.

31. Боровиков В. СТАТИСТИКА: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. Санкт-Петербург : Питер, 2001. 656 с.

32. Субботина А.В., Гржибовский А.М. Описательная статистика и проверка нормальности распределения количественных данных. Экология человека. 2014; 2: 51–7.

33. van Bruggen R., Drewniak A., Jansen M. et al. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. Mol. Immunol. 2009; 47: 575–81.

■ References

1. Acute rhinosinusitis: clinical recommendations. In: A.S. Lopatin (ed.). Moscow: Rossiyskoe obshchestvo rinologov, 2017: 36 p. (in Russian)

2. Krivopalov A.A. Rhinosinusitis: classification, epidemiology, etiology and treatment. Meditsinskiy sovet. 2016; 6: 22–5. (in Russian)

3. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang de Y., Wormald P.J. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. Rhinology. 2012; 50 (1): 1–12.

4. Ovchinnikov A.Yu., Edzhe M.A., Khon E.M., Korostelev S.A. Acute rhinosinusitis: the main misconceptions and the possibility of a standard herbal medicine. Meditsinskiy sovet. 2016; 6: 28–31. (in Russian)

5. Ryazantsev S.V., Krivopalov A.A., Eremin S.A., Zakharov G.P., Shabalin V.V., Shamkina P.A., Chufistova A.V. Topical antibacterial therapy for acute rhinosinusitis. RMZh. 2020; 4: 2–7. (in Russian)

6. Kosyakov S.Ya., Minavnina Yu.V. Place of topical steroid therapy in the treatment of acute rhinosinusitis. Meditsinskiy sovet. 2017; 16: 18–23. (in Russian)

7. The principles of etiopathogenesis therapy of acute rhinosinusitis: method. Recommendation. In: S.V. Ryazantsev (ed.). Saint Petersburg: Poliforum Grupp, 2015: 40 p. (in Russian)

8. Karpishchenko S.A., Lavrenova G.V., Shakhnazarov A.E., et al. Acute and chronic rhinosinusitis: additional opportunities of conservative treatment. Folia Otorhinolaryngologiae et Pathologiae Respiratoriae. 2018; 24 (4): 6268. (in Russian)

9. Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Ovchinnikov A.Yu., et al. Opportunities of non-puncture treatment of purulent rhinosinusitis. Rossiyskaya otorinolaringologiya. 2004; 3 (10): 150–2. (in Russian)

10. Referens Vidal' 2020. Medicines in Russia. Vidal' Rus, 2020: 1118 p. ISBN:978-5-9500273-9-0. (in Russian)

11. Iwasaki A., Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat. Immunol. 2015; 16 (4): 343–53. DOI: 10.1038/ni.3123.

12. Hannoodee S., Nasuruddin D.N. Acute Inflammatory Response. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310543>.

13. Koatz A.M., Coe N.A., Cicerán A., Alter A.J. Clinical and immunological benefits of OM-85 bacterial lysate in patients with allergic rhinitis, asthma, and COPD and recurrent respiratory infections. Lung. 2016; 194 (4): 687–97. DOI: 10.1007/s00408-016-9880-5.

14. Esposito S., Bianchini S., Bosis S., Tagliabue C., Coro I., Argentiero A., Principi N. A randomized, placebo-controlled, double-blinded, single-centre, phase IV trial to assess the efficacy and safety of OM-85 in children suffering from recurrent respiratory tract infec-

- tions. *J. Transl. Med.* 2019; 17 (1): 284. DOI: 10.1186/s12967-019-2040-y.
15. Esposito S., Bianchini S., Polinori I., Principi N. Impact of OM-85 given during two consecutive years to children with a history of recurrent respiratory tract infections: a retrospective study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019; 16 (6): E1065. DOI: 10.3390/ijerph16061065.
16. Yin M., Zhang Y., Li H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. *Front. Immunol.* 2019; 10: 145. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00145.
17. Friedman M. Mushroom polysaccharides: chemistry and anti-obesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods.* 2016; 5 (4): 80.
18. Camilli G., Tabouret G., Quintin J. The complexity of fungal β -glucan in health and disease: effects on the mononuclear phagocyte system. *Molecules.* 2016; 21 (7): 938.
19. Bashir K.M., Choi J.S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18 (9): 84–102.
20. Jesenak M., Urbancikova I., Banovcin P. Respiratory tract infections and the role of biologically active polysaccharides in their management and prevention. *Nutrients.* 2017; 9 (7): 779.
21. Elsayed A., Enshasy H., et al. Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. *Mediators Inflamm.* 2014; 10 (1): 55–81.
22. Vetricka V., Vetrickova J. Glucan supplementation enhances the immune response against an influenza challenge in mice. *Ann. Transl. Med.* 2015; 22 (2): 2305.
23. Muszyńska B., Grzywacz-Kisielewska A., Kała K., Gdula-Argasińska J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: a review. *Food Chem.* 2018; 243: 373–81.
24. Leentjens J., Quintin J., Gerretsen J., et al. The effects of orally administered beta-glucan on innate immune responses in humans, a randomized open-label intervention pilot-study. *PLoS One.* 2014; 9 (9): e108794.
25. Minov J., Bislimovska-Karadzhinska J., et al. Effects of pleuran (B-glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation on incidence and duration of COPD exacerbations. *J. Med. Sci.* 2017; 5 (7): 893–8.
26. Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G. Increment of antibiotic therapy efficiency in acute purulent rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya.* 2013; 3 (64): 10–6. (in Russian)
27. Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Kurtsier G.M., Simbirtsev A.S. Exploring effect of changing concentration in cytokines IL-1RA and IL-1 β of nasal secretions in patients undergoing immune correction to treat chronic polypous rhinosinusitis. *Immunologiya.* 2019; 40 (5): 5–10. (in Russian)
28. Bezrukova E.V., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Simbirtsev A.S. Changes of cytokines concentration of IL-1 β and IL-1RA in chronic polyposis rhinosinusitis. *Meditinskaya immunologiya.* 2019; 21 (6): 1155–62. (in Russian)
29. Patent RF No. 2450812, 20122450812 «Agent for treatment of infectious diseases of respiratory tract «Glyukaferon», 2012. (in Russian)
30. Shamtsyan M.M., Vorobeychikov E.V., Konusova V.G., Simbirtsev A.S. Immunomodulatory properties of higher basidial mushrooms. *Tsitokiny i vospalenie.* 2012; 11 (1): 26–37. (in Russian)
31. Borovikov V. *Statistics: the art of analyzing data on a computer. For professionals.* Saint Petersburg: Piter, 2001: 656 p. (in Russian)
32. Subbotina A.V., Grzhibovskiy A.M. Descriptive statistics and validation of the normality of the distribution of quantitative data. *Ekologiya cheloveka.* 2014; 2: 51–7. (in Russian)
33. van Bruggen R., Drewniak A., Jansen M., et al. Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles. *Mol. Immunol.* 2009; 47: 575–81.

© Коллектив авторов, 2020

Гурьянова С.В.^{1,2}, Гапонов А.М.^{3,4}, Писарев В.М.^{3,4},
Якушенко Е.В.³, Тутельян А.В.⁵, Александров И.А.³,
Цыпандина Е.В.⁴, Козлов И.Г.^{3,6}

Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Медицинский институт, 117198, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117198, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 141534, г. Москва, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 111123, г. Москва, Российская Федерация

⁶ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет им. Э. Канта» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 236041, г. Калининград, Российская Федерация

Резюме

Введение. Лекарственные препараты на основе производных мурамилпептидов на протяжении нескольких десятилетий являются объектом экспериментальных и клинических исследований. Внутриклеточный NOD2-рецептор, ответственный за связывание мурамилдипептида и его производных, остается привлекательной молекулярной мишенью для разработки новых лекарственных средств с известным механизмом действия. Одним из лигандов NOD2 является глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А). В работе впервые исследованы сигнальные механизмы, инициированные в НК-клетках с помощью ГМДП-А.

Материал и методы. Изолированные с помощью магнитной сепарации НК-клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров, инкубировали с 10 мкг/мл ГМДП-А в течение 6 и 16 ч. Уровень экспрессии генов определяли, используя набор Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip на приборе «Illumina iScan (Illumina, США). Данные статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ (v 2011.1, Illumina).

Результаты. Обнаружено, что ГМДП-А усиливает транскрипцию ряда генов, продукты которых участвуют в трансдукции сигналов с рецепторов, тем самым обеспечивая поддержание функциональной активности НК-клеток. ГМДП-А индуцирует синтез транскриптов MAPK-сигнального пути, сигнальных медиаторов VAV2, сигнального адаптора CRKL, усиливает синтез транскриптов генов регуляторной субъединицы 3(γ) фосфоинозитид-3-киназы и фосфолипазы C B1, контролирующей обмен фосфолипидов, активирует клетки организма при дефектах клеточного звена иммунитета. ГМДП-А значительно повышает уровень экспрессии следующих ключевых генов, связанных с контролем механизмов прямой и антителоопосредованной цитотоксической активности НК-клеток: *CRKL*, *VAV2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, семейство *MAPK*, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14*.

Заключение. Экспериментальные данные позволяют заключить, что ГМДП-А может быть эффективным средством противодействия ранним этапам онкогенной и вирусной трансформации НК-клетками, ключевыми клетками врожденного иммунитета.

Для корреспонденции
Гурьянова Светлана Владимировна –
кандидат биологических наук,
научный сотрудник ИБХ РАН,
Москва, Российская Федерация
E-mail: svgur@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Ключевые слова: натуральные киллерные клетки; глюкозаминилмурамилдипептид-кислота; транскриптом; MAPK-сигнальный путь; интерферон; противоинфекционный иммунитет; противоопухолевый иммунитет

Статья поступила 05.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Гурьянова С.В., Гапонов А.М., Писарев В.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Александров И.А., Цыпандина Е.В., Козлов И.Г. Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток. *Иммунология*. 2020; 41 (3): 235–248. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-235-248

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Guryanova S.V.^{1,2}, Gaponov A.M.^{3,4}, Pisarev V.M.^{3,4}, Yakushenko E.V.³, Tutelyan A.V.⁵, Alexandrov I.A.³, Tsipandina E.V.⁴, Kozlov I.G.^{3,6}

Glucosaminylmuramyl dipeptide acid (GMDP-A) modulates intracellular signaling pathways in natural killer cells

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Medical Institute, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

³ Dmitry Rogachev National Medical Scientific Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117198, Moscow, Russian Federation

⁴ Federal Scientific and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 141534, Moscow, Russian Federation

⁵ Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 111123, Moscow, Russian Federation

⁶ Immanuel Kant Baltic Federal University, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 236041, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract

Introduction. Medicines developed as derivatives of muramyl peptides have been the subject of experimental and clinical studies for several decades. The intracellular NOD2- receptor responsible for the binding of muramyl dipeptide and its derivatives remains an attractive molecular target for the development of new drugs with a known mechanism of action. GMDP-A belongs to one of the NOD2-receptor ligands. In this study signaling mechanisms initiated by GMDP-A were characterized for the first time in natural killer (NK) cells.

Material and methods. NK cells isolated by magnetic separation from peripheral blood of healthy donors were incubated with 10 µg/ml GMDP-A for 6 hours and 16 hours. The levels of genes expression were determined using the Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip kit and Illumina iScan instrument (Illumina, USA). The data were statistically processed using an application software package (v 2011.1, Illumina).

Results. It was found that GMDP-A enhanced the transcription of a number of genes associated with transduction of signals from receptors, thereby ensuring the maintenance of the functional activity of NK cells. GMDP-A induced the synthesis of transcripts of the MAPK signaling pathway, VAV2 signal mediators, the CRKL signal adapter, enhanced the synthesis of transcripts of the regulatory subunit 3 (γ) phosphoinositide-3-kinase and phospholipase C B1 genes that control phospholipid metabolism, activated the cells with defects in the cellular immunity link. GMDP-A significantly increases the expression level of the following key genes associated with the control of the mechanisms of direct and antibody-mediated cytotoxic activity of NK cells: *CRKL*, *VAV2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, the *MAPK* family, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14*.

Conclusion. Experimental data justify the high potential of the GMDP-A to counteract altered recognition of the early stages of oncogenic and viral transformation by key cells of the innate immunity, the NK cells.

Keywords: natural killer cells; glucosaminyl muramyl dipeptide acid; transcriptome; MAPK signaling pathway; interferon; anti-infection immunity; anti-tumor immunity

Received 05.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Guryanova S.V., Gaponov A.M., Pisarev V.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Aleksandrov I.A., Tsipandina E.V., Kozlov I.G. Glucosaminylmuramyl dipeptide acid (GMDP-A) modulates the intracellular signaling pathways of natural killer cells. *Immunologiya*. 2020; 41 (3): 235–48. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-235-248 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence

Svetlana V. Guryanova –
PhD, Research Scientist,
Shemyakin-Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry
of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
E-mail: svgur@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Введение

Одно из мировых направлений разработок лекарственных средств с противоопухолевой активностью – препараты на основе производных мурамилпептидов (МП), обладающих целым рядом преимуществ: известным механизмом действия и наличием специфического рецептора; относительно небольшим размером молекул (менее 1 кДа), которые могут быть получены синтетическим путем; малой токсичностью и отсутствием тяжелых побочных эффектов; относительно невысокой стоимостью производства субстанции и конечного продукта. МП являются минимальными структурными компонентами пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий, реализующих свою биологическую активность посредством связывания со специфическими NOD-рецепторами, локализованными внутри клеток. NOD-рецепторы относятся к NLR (NOD-like receptor) – семейству рецепторов врожденного иммунитета. Их связывание с МП приводит к активации NF-κB-сигнального пути и, как следствие, к синтезу цитокинов, которые активируют функции клеток противинфекционной и противоопухолевой защиты, а также гемопоэза. Белки NOD экспрессируются главным образом иммунными клетками, в том числе макрофагами, гранулоцитами, дендритными клетками и натуральными киллерными (НК)-клетками, а также и различными типами неиммунных клеток.

Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) – модифицированный аналог ГМДП, который является субстанцией лекарственного средства Ликолипид® (АО «Пептек», Российская Федерация) и более 25 лет используется в качестве лекарственного средства для коррекции иммунодефицитных состояний [1–3]. ГМДП-А имеет ряд преимуществ в сравнении с ГМДП – менее выраженная пирогенность, широкий диапазон активных концентраций [4] и увеличенный период полувыведения, что расширяет его терапевтические возможности и позволяет использовать в виде инъекционной лекарственной формы. Научный и практический интерес представляет исследование влияния ГМДП-А на функционирование НК-клеток для определения дальнейших стратегий и способов применения ГМДП-А в качестве лекарственного средства.

НК-клетки – одни из ключевых клеток иммунной системы, они имеют решающее значение в иммунном ответе на возбудителей инфекции и злокачественные опухоли. НК-клетки дифференцируются из общего для Т- и В-клеток лимфоидного предшественника, но в отличие от последних, высвобождают цитотоксические эффекторские молекулы непосредственно при встрече с инфицированной или трансформированной клеточной мишенью. НК-клетки, обнаруженные более 40 лет назад, являются крупными гранулярными лимфоцитами, способными убивать клетки-мишени без предварительной сенсibilизации, не затрагивая при этом здоровые аутологичные клетки. НК-клетки относят к системе врожденного иммунитета, поскольку при их созревании не происходит перестройки генов рецепторного аппарата.

НК-клетки распознают своими рецепторами молекулы МНС I класса, в норме представленные на всех ядросодержащих клетках. В инфицированных и опухолевых клетках молекулы МНС I класса отсутствуют или трансформированы, что является необходимым, но недостаточным сигналом для цитотоксического действия НК. Для уничтожения собственных измененных клеток организма, кроме отсутствия молекул МНС I класса, необходимо дополнительное распознавание НК-клетками молекул, индуцируемых клеточным стрессом, появляющихся в процессе малигнизации или инфицирования [5]. Распознавание НК-клетками молекул МНС I класса на аутологичных нормальных клетках происходит с помощью нескольких типов рецепторов: так называемых ингибиторных Ig-подобных рецепторов (KIR), Ig-подобных рецепторов лейкоцитов подсемейства B1 (LILRB1) и лектиновых рецепторов типа C – гетеродимерного комплекса CD94-NKG2A. Взаимодействие этих рецепторов с нормальными молекулами МНС I приводит к генерации ингибирующих сигналов, предотвращающих уничтожение аутологичных здоровых клеток. Инфицированные и опухолевые клетки часто подавляют экспрессию молекул МНС I класса, чтобы избежать узнавания цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ), но это приводит к их уязвимости перед НК-клетками. В этом случае НК-клетки взаимодействуют с клетками-мишенями с недостаточной экспрессией молекул МНС I класса, а их специфические ингибирующие рецепторы не могут распознавать свои лиганды, следствием чего является активация НК-клеток через их активирующие рецепторы с последующим уничтожением клеток-мишеней. Таким образом, НК-клетки могут эффективно уничтожать опухолевые и инфицированные клетки, которые перестали экспрессировать молекулы МНС I класса [6]. Активирующими рецепторами являются рецепторы цитотоксичности (NKp46, NKp44), лектиновые рецепторы типа C (NKG2D, CD94-NKG2C) и Ig-подобные рецепторы (2B4). Каждая НК-клетка обычно экспрессирует от двух до четырех ингибирующих рецепторов в дополнение к многочисленным рецепторам активации. Популяция НК-клеток в значительной степени гетерогенна, поскольку НК-клетки экспрессируют различные комбинации ингибирующих или активирующих рецепторов. Многообразие таких комбинаций определяет способность НК-клеток реагировать на различные стимулы и участвовать в иммунных ответах при различных патологических процессах. Кроме ингибирующих и активирующих рецепторов, НК-клетки несут на поверхности рецепторы цитокинов, гормонов и нейромедиаторов. Такой широкий набор рецепторов позволяет НК-клеткам первыми воспринимать сигналы об инфицировании вирусами или опухолевой трансформации клетки на ранних стадиях и уничтожать пораженную клетку, предотвращая тем самым дальнейшее развитие патологического процесса или распространение патогена.

НК-клетки классифицируют на две подгруппы в зависимости от их фенотипа и функций: CD56^{dim} и CD56^{bright}.

CD56^{dim} составляют 90 % общей популяции НК-клеток в периферической крови и экспрессируют низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG – FcR3a/CD16a. Функционально CD56^{dim} обладают высокой цитотоксичностью. Примерно 10 % НК-клеток принадлежат к CD56^{bright}-клеткам, преимущественно участвующим в продукции цитокинов. НК-клетки вторичной лимфоидной ткани (миндалины, лимфатические узлы и селезенка) отличаются от НК-клеток в периферической крови, так как они активируются дендритными клетками и секретируют цитокины, например, интерферон (ИФН), который стимулирует ЦТЛ-ответ [7].

Лизис клеток-мишеней НК-клетками преимущественно обеспечивается перфорином, гранулизином и гранзимами – белками, которые хранятся в так называемых литических гранулах, а при взаимодействии НК-клетки с клеткой-мишенью выбрасываются в результате дегрануляции. Гранзимы, попав при помощи перфорина в цитозоль клетки-мишени, индуцируют ее апоптоз. Меньший вклад в киллерную функцию НК-клеток вносят поверхностные молекулы семейства фактора некроза опухолей (ФНО), например FasL/CD178 и TRAIL/CD253, которые вызывают рецептор-зависимый апоптоз мишеней. Мишенями НК-клеток могут являться не только эукариотические клетки. Показано, что секретируемые НК-клетками гранзимы способны индуцировать микроптоз – процесс, подобный апоптотической гибели, – в бактериальных клетках (*E. coli*), паразитах (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *L. major*), тогда как гранулизин, нарушая мембрану микроба, способствует его некрозоподобной гибели [8]. 90 % НК-клеток экспрессируют рецепторы практически для всех цитокинов. Наиболее значимыми для активации НК-клеток являются рецепторы ИФН- α и интерлейкинов (ИЛ)-12, ИЛ-15 и ИЛ-18. Во время дифференцировки НК-клеток экспрессия некоторых цитокиновых рецепторов может уменьшаться. В то же время дифференцировка НК-клеток не влияет на стабильную экспрессию ими ИФН- γ .

Функциональная классификация биологических процессов и анализ геной онтологии (GO) показали, что гены, связанные с реализацией иммунных функций НК-клеток, составляют около 7 %, в то время как гены, связанные с клеточными и метаболическими процессами жизнеобеспечения, составляют большинство дифференциально экспрессируемых генов – 31 %. В связи с этим представляет интерес исследование экспрессии генов не только рецепторных структур и секретируемых цитокинов, но и генов белков метаболических путей, изменяющихся при действии МП.

Цитозольные Crk и Crk-подобные (CrkL – Crk-like) факторы являются членами семейства, связывающими тирозин-фосфорилированные белки с широко экспрессируемыми адаптерами, которые взаимодействуют с различными белками для выполнения ключевых ролей в путях сигнальной трансдукции, запускаемых активацией рецепторных и нерцепторных тирозинкиназ. Фактор Crk рекрутирует к цитоплазматической мем-

бране белки, участвующие в передаче сигнала, CrkL активирует сигнальные пути Ras- и Jun-киназ, является субстратом тирозинкиназы BCR-ABL и контролирует функцию НК-клеток посредством регуляции накопления активирующих рецепторов и фосфорилированных молекул Vav-1 в иммунологических синапсах [9]. Таким образом, Crk и CrkL играют критическую роль в клеточной структуре и подвижности, поддерживают целостность цитоскелета, регулируют цитотоксические функции, а также синтез цитокинов, в частности – ИФН- γ .

Тирозинкиназа Fyn семейства Src участвует в регуляции клеточного роста и в перфорин-зависимом уничтожении инфицированных клеток НК-клетками [10]. Нерцепторные тирозинкиназы Syk и Zap-70 являются членами семейства тирозинкиназ SYK. Эти цитоплазматические тирозинкиназы имеют общий двойной домен SH2, разделенный линкерным доменом. Активация Syk в меньшей степени зависит от фосфорилирования киназами семейства Src, чем Zap-70. Syk и Zap-70 передают сигналы от поверхностных рецепторов, включая CD74, Fc-рецептор и интегрины. Активация Syk происходит посредством связывания двух доменов SH2 с ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), остатки тирозина фосфорилируются киназами семейства Src. Связывание с фосфорилированным ITAM освобождает Syk от внутримолекулярного аутоингибирования и запускает его ассоциацию с рецепторными сигнальными молекулами, опосредованную ITAM-содержащим адаптером.

Малая ГТФаза RAC1 участвует в разнообразных динамических клеточных биологических процессах, включая пролиферацию клеток, выживание клеток, межклеточные контакты, эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), подвижность клеток и инвазивность. Эти процессы организуются посредством тонкой настройки активности RAC1 с помощью рецепторов и эффекторов клеточной поверхности, которые регулируют циклический переход RAC1-GDP (в выключенном состоянии)/RAC1-GTP (во включенном состоянии). RAC1 инициирует серию сигнальных сетей, включая регуляторный комплекс ремоделирования актинового цитоскелета, активацию протеинкиназ (PAKs, MAPKs) и факторов транскрипции (NF- κ B, Wnt/ β -catenin/TCF, STAT3, Snail), продукцию реактивного кислорода (NADPH-оксидазы, митохондриальные АФК). Таким образом, эта ГТФаза может проявлять воздействие на разных стадиях прогрессирования опухоли от дисплазии до метастатического каскада [11].

RAP-белки (RAP1, RAP2A, B, C) являются низкомолекулярными ГТФазами семейства RAS. Через различные сигнальные пути они опосредуют клеточную адгезию, пролиферацию, активацию генов и другие клеточные события. Активация RAP-сигнала жестко регулируется несколькими специфическими регуляторными белками, включая факторы обмена гуаниновых нуклеотидов и белки, активирующие ГТФазы. В иммунной и гемопоэтической системах RAP-сигнал играет решающую роль в развитии и функционировании

нии практически всех линий лимфоцитов и гемопоэтических клеток. Важно отметить, что, нарушение регуляции RAR-сигнала может приводить к патологическим состояниям, в том числе лейкозам и аутоиммунным реакциям. Транслокация в ядро активных ГТФ-форм этих белков обнаружена при различных онкологических заболеваниях, в том числе при плоскоклеточном раке. Регуляция RAR-сигналов предоставляет потенциальную возможность контроля заболеваний человека, в том числе злокачественных [12].

Белки семейства Vav являются факторами обмена гуаниновых нуклеотидов для семейства Rho/Rac малых ГТФ-связывающих белков. Кроме того, они имеют домены, которые опосредуют белок-белковые взаимодействия, включая один SH2-домен и два SH3-домена. Vav1, Vav2 и Vav3 играют решающую роль в регуляции изоформ фосфолипазы C γ (PLC gamma) с помощью рецепторов, связанных с ITAM, который активирует пути, ведущие к связанной с белком актином цитоскелетной перестройке и транскрипционным изменениям [13].

Ген *PLCB1* кодирует 1-фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-фосфодиэстеразу b-1 – фермент, который катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. Эта реакция использует кальций в качестве кофактора и играет важную роль во внутриклеточной трансдукции многих внеклеточных сигналов.

Фосфоинозитид-3-киназы PI3K осуществляют обмен фосфата в инозитол-фосфолипидах в составе плазматической мембраны и координирует выживание, пролиферацию и миграцию НК-клеток [14]. PIK3R1 и PIK3R3 являются изоформами регуляторных субъединиц фосфоинозитид-3-киназы PI3K класса I, регулирующих каталитическую субъединицу PI3K-комплекса в клетках, включая трансформированные НК-клетки. Другая субъединица – PIK3C2G – фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталитическая субъединица типа 2 γ , входящая в состав комплекса PI3K класса II, в отличие от широко представленных в различных тканях белков PI3K класса I и других белков класса II экспрессируется преимущественно в ограниченных компартментах – печени, поджелудочной железе, молочной железе, тонком кишечнике, предстательной железе. Известно об этой форме мало, однако единичные данные показали, что PIK3C2G экспрессируется в эндосомах и участвует в контроле клеточного метаболизма [15]. Данных об экспрессии этой формы белков PI3K в НК-клетках нет.

Продукты генов *FCGR* принадлежат к трем группам рецепторов: рецептор с высоким сродством (FCGR1) и две группы рецепторов с низким сродством (FCGR2 и FCGR3). У человека ген *FCGR3A* кодирует Fc-рецептор IIIa с низкой аффинностью (CD16a), являющийся частью кластера дифференцировки – молекулярного комплекса клеточной поверхности. Молекула CD16 является одним из наиболее мощных активационных рецепторов НК-клеток и представляет собой трансмембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов.

У человека CD16 является низкоаффинным рецептором Fc-фрагментов антител субклассов IgG1 и IgG3. Существуют две изоформы этого антигена – CD16a (FCGR3A) и CD16b (FCGR3B), причем НК-клетки экспрессируют только первую из них. Антитела субклассов IgG1 и IgG3 играют роль опсоинов, своими Fab-фрагментами взаимодействуя с поверхностными антигенами клеток-мишеней, а Fc-фрагментами – с CD16, что индуцирует литическую атаку НК-клеток против мишеней, покрытых антителами, в реакции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). Активационный сигнал от CD16 передается через Src-киназы, которые фосфорилируют ITAM-мотивы адапторных белков CD3Z, и FcsR γ , которые, в свою очередь, привлекают и активируют тирозинкиназы Syk и Zap-70. Мутации гена *FCGR3A* вызывают дефицит НК-клеток и ассоциированы с онкогенными вирусными инфекциями, которые могут способствовать развитию рака [16]. Генетический полиморфизм *FCGR3A* ассоциируется с чувствительностью к блокаторам ФНО при спондилоартрите, псориазе и болезни Крона [17]. Оценка экспрессии данного гена в НК-клетках имеет большое значение в диагностике, а также в профилактике и терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний.

Фосфатидилинозитол-специфические ферменты фосфолипазы C (β и γ) катализируют гидролиз фосфолипидов. Они активируются рецепторными и нерепторными тирозинкиназами и являются наиболее известными фосфолипазами по их роли в передаче сигналов липидов и пролиферации клеток.

ИФН представляют собой семейство цитокинов с мощными противовирусными, антипролиферативными и иммуномодулирующими свойствами. На основании их взаимодействия с конкретным рецептором клеточной поверхности различают три основных типа ИФН: I, II и III. У человека существует 13 различных генов, кодирующих ИФН- α , обозначаемых как *IFNA1*, *IFNA2*, *IFNA4*, *IFNA5*, *IFNA6*, *IFNA7*, *IFNA8*, *IFNA10*, *IFNA13*, *IFNA14*, *IFNA16*, *IFNA17* и *IFNA21* [18].

Члены семейства белков передачи сигналов и активаторов транскрипции STAT участвуют в регуляции транскрипции и способны значительно изменять процессы пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток. В основном они активируются мембранными рецептор-ассоциированными киназами Janus (JAK). Нарушение этого пути часто наблюдается в первичных опухолях и приводит к усилению ангиогенеза, что повышает выживаемость опухолей и иммуносупрессию. Исследования с использованием нокаута генов доказали, что белки STAT участвуют в развитии и функционировании иммунной системы и играют роль в поддержании иммунной толерантности [19].

Еще одна группа участников сигнальных механизмов пострецепторного этапа передачи – это митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), первоначально называемые ERK, которые представляет собой цепочку регуляторных белков в клетке. По этой цепочке пере-

дается сигнал от рецептора на поверхности мембраны клетки в ядро с последующей активацией транскрипции. Белки сигнального пути регулируют активность друг друга путем присоединения фосфатных групп к соседнему белку (фосфорилирование белка), «включая» или «выключая» его таким образом. Мутация одного из белков МАРК-пути разрушает правильное прохождение сигнала от рецептора и провоцирует развитие многих видов рака [20].

Семейство ФНО объединяет целый ряд различных трансмембранных белков с гомологичным доменом ФНО. Основная роль ФНО заключается в регуляции иммунных клеток, влиянии на липидный метаболизм и коагуляцию, устойчивость к инсулину, функционирование эндотелия, стимуляцию провоспалительных цитокинов, ИФН- γ . Молекулы семейства ФНО и их рецепторы относят к важнейшим факторам врожденного иммунитета, защищающим от внутриклеточных паразитов, вирусов и трансформированных клеток [21]. Имеются данные о том, что один из механизмов противоопухолевого действия НК-клеток связан с эффектами их мембраноассоциированных или секретируемых молекул ФНО и ИФН- γ , обеспечивающих ремоделирование микроокружения опухоли и дифференцирование клеток рака [22].

Эффекторные функции НК-клеток во многом зависят от активации/деактивации многочисленных внутриклеточных протеинкиназ путем их фосфорилирования/дефосфорилирования, трансдукции сигнала от рецепторов через цитозольные белки в ядро при участии тирозинкиназ, фосфолипаз, адаптерных белков [9, 10]. Поэтому исследования, направленные на выяснение того, какие именно сигнальные механизмы активируются при действии ГМДП-А на НК-клетки, помогут оценить потенциал препарата как регулятора дифференцировки и созревания НК-клеток, их цитотоксической и секреторной активности.

Материал и методы

Мурамилпептид. N-ацетил-D-глюкозаминил-(b1→4)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютаминная кислота (ГМДП-А) был синтезирован в компании АО «Пептек» (Российская Федерация) согласно разработанным ранее методам [23, 24].

Выделение моноцитов периферической крови здоровых доноров. Мононуклеарные клетки (МНК) получали из периферической крови условно здоровых добровольцев мужского пола в возрасте от 24 до 35 лет. Образцы крови были получены из отделения трансфузиологии НМИЦ «ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва) после предварительного тестирования в соответствии с протоколом заготовки препаратов донорской крови.

Венозную кровь, стабилизированную K_3 ЭДТА, смешивали с равным объемом фосфатного буфера, наплавали на градиент плотности фиколла-верографина (1,077) и центрифугировали 25 мин при 1000g при комнатной температуре. После окончания центрифугирова-

ния клетки, собранные на границе градиента плотности, ресуспендировали в среде RPMI-1640 без сыворотки и центрифугировали 8 мин при 200g. Процедуру повторяли еще дважды. Выделенные и отмытые МНК ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone Laboratories, Inc., США) и 40 мкг/мл гентамицина (полная среда), после чего подсчитывали в камере Горяева.

Выделение НК-клеток из МНК методом магнитной сепарации. Фракцию НК-клеток выделяли из МНК с помощью магнитной сепарации, используя МНК и наборы NK Cell Isolation Kit, Human (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя. Выделенные клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 8 мин. Осадок клеток ресуспендировали в полной среде RPMI-1640, подсчитывали и вносили в лунки 24-луночного планшета в концентрации 5×10^5 клеток на 1 мл полной среды. С помощью проточной цитофлуориметрии установили, что чистота выделенной популяции НК-клеток (CD3-CD19-CD56⁺) составляла 95 %.

ГМДП-А вносили в объеме не более 1 % от общего объема среды культивирования в концентрации 10 мкг/мл. В контрольные лунки вносили эквивалентный объем полной среды. После внесения препарата клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, в течение 6 и 16 ч.

Выделение РНК и реакция обратной транскрипции. По окончании культивирования из лунок осторожно удаляли 0,4 мл среды культивирования и добавляли 0,8 мл Trizol Reagent (Invitrogen, США). Далее следовали протоколу производителя. Сразу после выделения суммарной РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора Ambion Total-Prep cRNA Amplification Kit (Invitrogen, США) согласно прилагаемого к набору протокола.

Исследование экспрессии генов. Уровень экспрессии генов исследовали с использованием набора Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip на приборе Illumina iScan (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Genome Studio software (v 2011.1, Illumina, США). Гены и их условные обозначения представлены в табл. 1.

Результаты

Исследована экспрессия 48 генов, ответственных за синтез цитокинов, мембранных рецепторов, адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм в НК-клетках, изолированных из МНК 5 доноров. Результаты сравнения уровней экспрессии генов в образцах НК-клеток человека, подвергшихся в течение 6 и 16 ч (экспериментальная группа) и не подвергшихся (контрольная группа) воздействию ГМДП-А, представлены в табл. 2.

Как видно на рис. 1, экспрессия гена *CRKL* под действием ГМДП-А достоверно повышается на 48–70 %

Таблица 1. Описание исследованных генов

Ген	Описание кодируемого продукта
<i>CRK</i>	Член семейства белков, связывающих тирозинфосфорилированные белки
<i>CRKL</i>	Сrk-подобный белок – субстрат тирозинкиназы BCR-ABL
<i>FYN</i>	Тирозинкиназа семейства Src
<i>SYK</i>	Нерецепторная тирозинкиназа
<i>ZAP70</i>	Ассоциированная с ζ-цепью (TCR) протеинкиназа 70 кДа
<i>RAC3</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC2</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC1</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAP1A</i>	Член семейства Ras малых ГТФ-связывающих белков
<i>RAPGEF1</i>	Фактор обмена Раpаn-гуаниновых нуклеотидов (GEF) 1
<i>RAP2A</i>	RAP2A, член семейства онкогенов RAN
<i>VAV1</i>	Vav-1 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV2</i>	Vav-2 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV3</i>	Vav-3 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>PLCB1</i>	Фосфолипаза C, β1 (фосфоинозитид-специфичная)
<i>FCGR3A</i>	FcRIIIa, рецептор Fc-фрагмента IgG, низкое сродство (CD16a)
<i>PLCG1</i>	Фосфолипаза C, γ 1
<i>PLCG2</i>	Фосфолипаза C, γ 2
<i>PIK3R3</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 3 (γ)
<i>PIK3R1</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 1 (α)
<i>PIK3C2G</i>	Фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталитическая субъединица типа 2γ
<i>IFNA1</i>	ИФН-α1
<i>IFNA6</i>	ИФН-α6
<i>IFNAR1</i>	Рецептор ИФН (α, β и ω) 1
<i>IFNA21</i>	ИФН-α21
<i>STAT2</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 2, 113 кДа
<i>STAT5A</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5A
<i>STAT6</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 6, индуцированный ИЛ-4
<i>MAPK8IP1</i>	МАРК 8, взаимодействующий белок 1
<i>MAP2K7</i>	МАРК-киназа 7
<i>MAP4K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP3K6</i>	МАРК-киназа 6
<i>MAPKAPK5</i>	МАРК 5
<i>MAPK8</i>	МАРК 8
<i>MAP3K14</i>	МАРК-киназа 14
<i>MAPKAPK3</i>	МАРК 3
<i>MAPK13</i>	МАРК 13
<i>MAP3K10</i>	МАРК-киназа 10
<i>MAPK10</i>	МАРК 10
<i>MAP2K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP4K3</i>	МАРК-киназа 3
<i>TNFRSF9</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 9
<i>TNFRSF10B</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 10
<i>TNFRSF13C</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 13
<i>TNFRSF14</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 14
<i>TNFSF18</i>	Суперсемейство ФНО (лиганд), член 18
<i>TNFAIP6</i>	ФНОα-индуцированный белок 6

в первые 6 ч и сохраняет повышенные значения на протяжении 16 ч, при этом экспрессия гена *CRK* остается без изменений.

Данные табл. 2 показывают, что уровень экспрессии гена *FYN*, кодирующего тирозинкиназу семейства Src, которая участвует в регуляции клеточного роста

и в перфорин-зависимом уничтожении инфицированных НК-клеток, не изменялся под действием ГМДП-А. Экспрессия гена *SYK*, кодирующего другую тирозинкиназу, которая участвует в передаче сигнала от нескольких мембранных рецепторов, под влиянием ГМДП-А уменьшалась почти в два раза. Этот эффект был непро-

Таблица 2. Экспрессия генов в НК-клетках под влиянием ГМДП-А (10 мкг/мл)

Ген	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Образец 4		Образец 5	
	время инкубации с ГМДП-А (10 мкг/мл), ч									
	6	16	6	16	6	16	6	16	6	16
<i>CRKL</i>	1,67*	1,41*	1,56*	1,26	1,72*	1,41*	1,70*	1,48*	1,47*	1,37
<i>CRK</i>	1,06	1,19	1,06	1,12	1,11	1,13	1,23	1,20	1,06	0,95
<i>FYN</i>	1,05	1,21	0,93	1,17	0,98	1,19	1,16	1,28	0,87	1,08
<i>SYK</i>	0,47*	0,87	0,45*	0,71	0,61*	0,82	0,50*	0,98	0,49*	0,84
<i>ZAP70</i>	0,82	1,56*	0,82	1,44*	0,94	1,61*	1,04	1,67*	0,83	1,45*
<i>RAC3</i>	1,26	1,63*	0,98	1,58*	1,10	1,62*	1,28	1,82*	0,93	1,39
<i>RAC2</i>	1,21	1,06	1,11	1,06	1,13	1,14	1,34	1,07	1,17	1,03
<i>RAC1</i>	0,78	0,79	0,69	0,60	0,74	0,65	0,93	0,91	0,72	0,74
<i>RAP1A</i>	1,19	1,68*	1,05	1,62*	1,31	1,67*	1,40	1,79*	1,22	1,68*
<i>RAPGEF1</i>	1,21	1,46*	1,16	1,37	1,34	1,47*	1,28	1,47*	1,01	1,15
<i>RAP2A</i>	1,48*	1,41	1,29	1,33	1,30	1,44*	1,72*	1,42*	1,41*	1,34
<i>VAV3</i>	0,84	1,91*	0,81	1,89*	0,84	1,97*	0,99	1,98*	0,72	1,91*
<i>VAV2</i>	1,31	1,56*	1,29	1,51*	1,31	1,78*	1,32	1,58*	1,27	1,38
<i>VAV1</i>	0,54*	0,59*	0,47*	0,37*	0,58*	0,43*	0,55*	0,67	0,36*	0,46*
<i>PLCB1</i>	1,07	2,38*	0,95	2,21*	0,99	2,44*	1,11	2,43*	0,91	2,14*
<i>FCGR3A</i>	1,13	2,02*	0,98	1,82*	1,02	1,94*	1,18	2,11*	0,97	1,77*
<i>PLCG1</i>	0,82	1,29	0,78	1,14	0,98	1,17	0,95	1,30	0,84	1,14
<i>PLCG2</i>	0,55*	0,39*	0,46*	0,37*	0,46*	0,41*	0,55*	0,44*	0,41*	0,20*
<i>PIK3R3</i>	1,92*	2,07*	1,79*	2,04*	1,85*	2,09*	1,94*	2,09*	1,75*	2,04*
<i>PIK3R1</i>	1,06	1,66*	1,03	1,54*	1,11	1,55*	1,21	1,66*	1,04	1,57*
<i>PIK3C2G</i>	1,46*	1,37	1,34	1,24	1,44*	1,29	1,67*	1,40	1,47	1,21
<i>IFNA1</i>	1,45*	2,34*	1,26	2,23*	1,26	2,28*	1,48*	2,36*	1,32	2,25*
<i>IFNA6</i>	1,52*	2,02*	1,47*	1,99*	1,55*	2,18*	1,54*	2,13*	1,47*	2,04*
<i>IFNAR1</i>	1,24	1,83*	1,21	1,72*	1,43*	2,00*	1,43*	1,85*	1,19	1,78*
<i>IFNA21</i>	0,65	1,70*	0,45*	1,69*	0,60	1,76*	0,67	1,74*	0,52*	1,72*
<i>STAT6</i>	1,04	2,33*	0,81	2,30*	0,91	2,32*	1,10	2,41*	0,93	2,31*
<i>STAT5A</i>	1,29	1,64*	1,00	1,49*	1,00	1,72*	1,42*	1,74*	1,18	1,52*
<i>STAT2</i>	0,92	1,47*	0,92	1,44*	1,08	1,52*	1,08	1,50*	0,97	1,43*
<i>MAPK8IP1</i>	1,10	2,74*	0,87	2,55*	0,96	2,65*	1,15	2,76*	0,90	2,51*
<i>MAP2K7</i>	2,32*	2,37*	2,21*	2,26*	2,26*	2,51*	2,41*	2,42*	2,22*	2,23*
<i>MAP4K2</i>	1,22	2,16*	1,20	2,15*	1,25	2,40*	1,28	2,18*	1,23	1,95*
<i>MAP3K6</i>	1,79*	2,13*	1,76*	2,10*	1,84*	2,13*	1,92*	2,19*	1,82*	2,14*
<i>MAPKAPK5</i>	0,59	2,03*	0,54	2,01*	0,57	2,01*	0,72	2,10*	0,43*	1,95*
<i>MAPK8</i>	0,66	1,84*	0,45*	1,74*	0,61	1,77*	0,78	1,86*	0,48*	1,75*
<i>MAP3K14</i>	0,76	1,84*	0,71	1,75*	0,94	1,82*	1,03	1,88*	0,74	1,83*
<i>MAPKAPK3</i>	1,38	1,80*	1,37	1,76*	1,38	1,81*	1,39	1,88*	1,38	1,71*
<i>MAPK13</i>	1,51*	1,79*	1,49*	1,74*	1,57*	1,81*	1,60*	1,81*	1,51*	1,77*
<i>MAP3K10</i>	0,89	1,59*	0,75	1,52*	0,79	1,52*	0,91	1,66*	0,78	1,54*
<i>MAPK10</i>	1,08	1,53*	0,95	1,36*	1,12	1,36*	1,11	1,61*	0,79	1,34*
<i>MAP2K2</i>	0,84	1,46*	0,84	1,37*	1,04	1,45*	0,96	1,48*	0,91	1,22*
<i>MAP4K3</i>	1,19	1,41*	1,09	1,32*	1,11	1,36*	1,34	1,53*	1,06	1,34*
<i>TNFRSF9</i>	0,80	3,32*	0,56*	3,30*	0,58*	3,37*	0,92	3,32*	0,58	3,23*
<i>TNFRSF14</i>	1,61*	2,29*	1,53*	2,23*	1,55*	2,25*	1,65*	2,46*	1,44*	2,28*
<i>TNFSF18</i>	2,11*	1,63*	2,11*	1,58*	2,12*	1,65*	2,20*	1,79*	2,11*	1,66*
<i>TNFAIP6</i>	0,74	1,61*	0,63	1,55*	0,64	1,69*	0,80	1,66*	0,69	1,62*
<i>TNFRSF13C</i>	0,80	1,59*	0,54	1,57*	0,55*	1,81*	0,82	1,86*	0,59	1,56*
<i>TNFRSF10B</i>	1,00	1,54*	0,82	1,53*	1,04	1,63*	1,18	1,54*	0,85	1,53*

Примечание. Здесь и на рис. 1–4 представлены значения отношения InA/InK , где InA – натуральный логарифм нормализованного значения сигнала в опытной пробе A (инкубация с ГМДП-А); InK – то же, но для контрольной пробы K (инкубация клеток в отсутствие ГМДП-А). * – $p < 0,05$ – достоверность различий в опытной пробе (A) по сравнению с контрольной пробой (K).

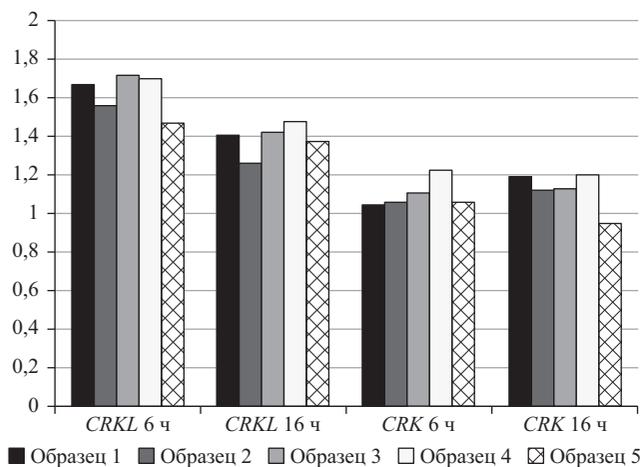


Рис. 1. Экспрессия генов *CRKL* и *CRK* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

должительным и наблюдался только в первые 6 ч воздействия препарата (рис. 2).

Обнаружено, что экспрессия гена *ZAP70* под действием ГМДП-А не изменялась через 6 ч и значительно, на 50 %, увеличивалась через 16 ч. Экспрессия генов *RAPGEF1* и *RAP2A* в НК-клетках под действием ГМДП-А существенно не изменяется; только экспрессия гена *RAP1A* достоверно увеличивалась во всех образцах НК-клетках через 16 ч. ГМДП-А в значительной степени влияет и на экспрессию генов семейства *VAV*, продукты которых являются сигнальными медиаторами для семейства малых ГТФ-связывающих белков Rho/Rac, опосредующих обмен гуаниновых нуклеотидов. Экспрессия гена *VAV1* достоверно уменьшалась через 6 ч во всех образцах НК-клеток в 2–2,5 раза, и это уменьшение сохранялось в течение всего 16-часового периода наблюдения. В противоположность этому под воздействием ГМДП-А экспрессия генов *VAV2* и *VAV3* увеличивалась практически во всех образцах НК-клеток, но только через 16 ч. ГМДП-А через 16 ч достоверно увеличивал экспрессию гена *PLCB1* более чем 2 раза во всех образцах культивируемых НК-клеток (см. табл. 2).

Полученные результаты указывают на выраженную ГМДП-А-индуцированную экспрессию генов *PIK3R1* и *PIK3R3*, кодирующих изоформы регуляторных субъединиц фосфоинозитид-3-киназы PI3K класса I в НК-клетках, и в особенности *PIK3R3*, транскрипция которой была усилена под воздействием препарата более чем в 2 раза. Транскрипция другой субъединицы – *PIK3C2G*, относящейся к ферментам PI3K класса II, характеризовалась лишь слегка повышенным уровнем в некоторых культурах НК-клеток, стимулированных ГМДП-А. Через 16 ч воздействия ГМДП-А в НК-клетках наблюдалось увеличение на 77–110 % экспрессии гена *FCGR3A*, кодирующего низкоаффинный рецептор Fc-фрагмента IgG (CD16a).

При исследовании экспрессии генов *PLCG1* и *PLCG2* в НК-клетках человека обнаружено, что, в отличие от гена *PLCB1*, экспрессия гена *PLCG2* под воздействием

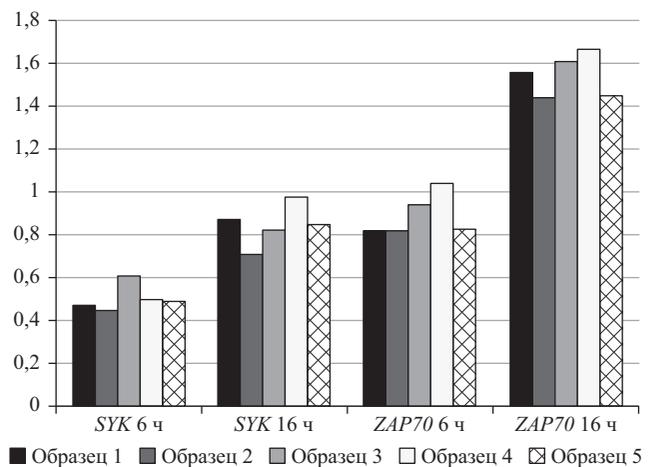


Рис. 2. Экспрессия генов *SYK* и *ZAP70* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

ГМДП-А во всех пяти образцах НК-клеток более чем двукратно уменьшалась через 6 ч и в еще более значительной степени – через 16 ч ($p < 0,05$). Выраженные изменения транскрипционной активности аналогичного по функции гена *PLCG1* практически отсутствовали ($p > 0,05$) (рис. 3).

ГМДП-А стимулировал экспрессию генов ИФН I-го типа и их рецептора, причем содержание транскриптов генов *IFNA1* и *IFNA6* повышалось в значительной степени уже через 6 ч, а через 16 ч их экспрессия увеличивалась более чем вдвое. При этом уровень экспрессии гена *IFNA21* через 6 ч понижался почти в 2 раза и троекратно возрастал по отношению к первоначальному падению к 16 ч инкубации с препаратом. Повышенная экспрессия гена рецептора ИФН- α – *IFNAR1* – наблюдалась уже в первые 6 ч и еще через 10 ч экспрессия гена продолжала увеличиваться. Под воздействием ГМДП-А в течение 16 ч экспрессия генов *STAT*, продукты которых участвуют в передаче сигналов

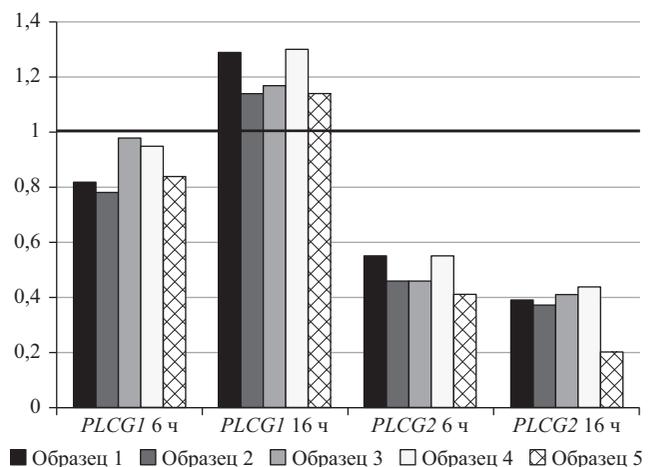


Рис. 3. Экспрессия генов фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы $C\gamma$ -1 (*PLCG1*) и фосфатидилинозитол-специфической фосфолипазы $C\gamma$ -2 (*PLCG2*) в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

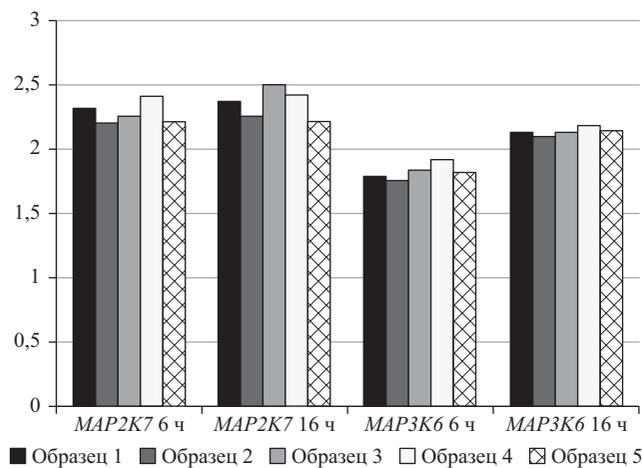


Рис. 4. Экспрессия генов *MAP2K7* и *MAP3K6* в НК-клетках под действием ГМДП-А в течение 6 и 16 ч

и активации транскрипции, стабильно увеличивалась во всех образцах. Наблюдалось более чем двукратное усиление экспрессии гена *TNFSF18* уже через 6 ч инкубации НК-клеток с ГМДП-А, полуторакратное увеличение экспрессии генов *TNFAIP6*, *TNFRSF13C*, *TNFRSF10B* и двукратное увеличение экспрессии генов *TNFRSF9*, *TNFRSF14*, *TNFSF18* в НК-клетках через 16 ч (см. табл. 2).

Активация экспрессии генов, кодирующих белки MAPK-пути, наблюдалась в отношении всех изученных участников сигнального пути MAPK уже через 6 ч воздействия ГМДП-А. Экспрессия двух из них – *MAP3K6* и *MAP2K7* – возросла более чем вдвое через 16 ч после добавления препарата в культуру клеток (рис. 4).

Обсуждение

Как видно из табл. 2, ГМДП-А воздействует на различные этапы фосфорилирования MAPK, гидролиз фосфолипидов, экспрессию адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами. Известно, что сигнальные адаптеры CrkL и Crk, интегрируя внешние и внутренние клеточные сигналы, координируют динамическую активацию клеточных сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию альтернативного сплайсинга молекул РНК – процесса, критически значимого для онкогенеза. Crk, начиная с эмбриогенеза, регулирует различные внутриклеточные события, которые требуют организованной динамики цитоскелета. Его постоянное наличие является важным условием для поддержания нормального функционирования клетки. Нокдаун как *CRK*, так и *CRKL* в фибробластах приводил к уменьшению площади клеточной поверхности и образованию округлого клеточного фенотипа. Эти морфологические изменения сопровождалось уменьшением участков адгезии, снижением количества примембранных актиновых микрофиламентов и разрушением микротрубочек. Кроме того, снижалась спонтанная подвижность клеток, в том числе – в тесте заживления «раневого» повреждения

in vitro. Дальнейшие исследования сигнальной трансдукции в цитотоксическом иммунологическом синапсе НК-клеток показали, что нокдаун гена *CRKL* значительно уменьшал конъюгацию, дегрануляцию и цитотоксичность НК-клеток, накопление как F-актина, так и фосфорилированного Vav-1 в цитотоксическом иммунологическом синапсе. При этом нарушалась поляризация центра организации микротрубочек у рецептора NKG2D, необходимого для проявления цитотоксичности НК-клеток. Кроме того, нокдаун *CRKL* приводил к снижению накопления лигандов CD16 и NKG2D на мембране НК-клеток [25]. В других экспериментах была продемонстрирована существенная роль белков Crk и CrkL в контроле активации и ингибирования НК-клеток, в том числе в активации рецептора CD16 и фосфорилированного Vav-1 [26]. Поэтому представляло интерес исследовать эффект ГМДП-А на экспрессию *CRKL* в НК-клетках человека. Обнаруженное в данном исследовании значительное увеличение экспрессии гена *CRKL* под действием ГМДП-А может лежать в основе возрастания цитотоксичности НК-клеток под влиянием препарата, обнаруженной ранее [27].

Известно, что Syk опосредует разнообразные биологические функции, включая клеточную адгезию, ангиогенез. Syk активируется лектинами С-типа и интегринами и запускает CARD9/CARMA1-BCL10-MALT1-путь и NLRP3-зависимое воспаление. Syk играет существенную роль в аллергических и аутоиммунных заболеваниях, а также в развитии гематологических злокачественных новообразований, таких как В-клеточные лимфомы. Новый ингибитор Syk оказывал выраженные клинически благоприятные эффекты при ревматоидном артрите человека, В-клеточных лимфомах, тромбоцитопении [28].

В отличие от эволюционно более древней Syk-киназы, представленной у дрозофилы и во всех гемопоэтических клетках млекопитающих, Zap-70 преимущественно экспрессируется в НК-клетках и Т-лимфоцитах. Нокдаун генов *SYK* и *ZAP70* предотвращает реакции FcγR-опосредованной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [29]. Данные табл. 2 указывают на то, что в отличие от ингибирующего эффекта на экспрессию гена *SYK*, ГМДП-А через 16 ч на 50 % увеличивал уровень экспрессии гена *ZAP70*. Возможно, что именно Zap-70-зависимые процессы необходимы для активации препаратом ГМДП-А цитотоксического механизма НК-клеток, тогда как снижение уровня Syk-киназы под действием ГМДП-А может иметь значение для запуска других сигнальных путей, что объясняет положительный эффект ГМДП-А в модели септического шока [30], а также клинический эффект ГМДП, прототипа ГМДП-А при лечении аллергических заболеваний [31], псориаза [32], тромбо- и цитопений [33].

Компоненты сигнального пути RAP1 – низкомолекулярные ГТФазы семейства RAS. Белки RAP контролируют формирование иммунологического синапса в иммунокомпетентных клетках, их миграцию и адгезию к клеткам-мишеням, играя значительную роль

в поддержании функциональной активности НК-клеток. Интересно, что в НК-клетках человека именно продукт гена *RAP1A* опосредует NKG2D-стимулированную активацию *GrkL*-регулируемого цитотоксического механизма, опосредованного адгезией НК-клеток, поляризацией цитотоксических гранул и их экзоцитозом [34]. Поэтому обнаруженные в нашем исследовании стимулирующие эффекты ГМДП-А на экспрессию обоих генов – *CRKL* и *RAP1A* – указывают на общность сигнальных механизмов, инициируемых ГМДП-А и запускаемых в естественных условиях через активацию рецептора NKG2D.

Усиление активности НК-клеток человека опосредуется сигнальными механизмами, в которых участвуют и *Vav-1*, и *Vav-2*. Однако воздействие ГМДП-А приводило к усилению экспрессии только гена *VAV2*, что, возможно, может отличать сигнальные механизмы, запускаемые ГМДП-А и NKG2D: в последнем случае вовлечение именно сигнального медиатора *Vav-1* с участием трансмембранного адаптора DAP-10 является основным механизмом, приводящим к запуску эффекторных элементов цитотоксичности НК-клеток.

Ген *PLCB1* кодирует фосфолипазу *Cb(PLCB)-1*, которая катализирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Ген *PLCB1* играет решающую роль в запуске программы, ответственной за дифференцировку миобластов и остеогенез у мыши. Продукт гена *PLCB1* – изоформа PI-PLCB1 – определяет внутриядерный фосфоинозитидный цикл, при котором активация ядерного PI-PLC приводит к генерации диацилглицерина внутри ядра. Метаболизм фосфоинозиотида в ядре, открытый еще в 1987 г. Л. Соссо [35], связан с контролем пролиферации и дифференцировки различных клеток, в том числе НК-клеток. Было показано, что, несмотря на существование двух других изоформ PLCb, только PLCB1 характеризовалась исключительной локализацией в ядре, где она контролирует фосфотидилинозитид-связанные сигнальные процессы в НК-клетках, стимулированных ИЛ-2. При этом активацию PI-PLCB1 в ядре путем фосфорилирования осуществляла транслоцированная в ядро MAP-киназа, распознающая последовательности аминокислот 980–983 (Pro-Ser-Ser-Pro) в структуре PLCB1. Интересно, что подобная активация PI-PLCB1 и обусловленные ею фосфоинозитид-связанные процессы в ядре, приводящие к выраженной цитотоксической активности клеток, были обнаружены и при генерации цитотоксических НК-клеток с помощью других провоспалительных цитокинов – ИЛ-12 и ИЛ-15 [36]. Следует полагать, что ГМДП-А, вызвавший усиление экспрессии гена *PLCB1*, имитирует сигнальные процессы, общие для ключевых цитокинов иммунной системы – ИЛ-2, ИЛ-12 и ИЛ-15 и приводящие к тому же результату – усилению цитотоксической активности НК-клеток.

Рецептор FcR3a/CD16a участвует в опосредованных НК-клетками реакциях АЗКЦ. Достоверное увеличение экспрессии гена *FCGR3A* объясняет способ-

ность ГМДП-А повышать цитотоксическую активность НК-клеток.

Другой фосфатидилинозитол-специфический фермент – фосфолипаза *Cγ (PLCG)*, катализирующий гидролиз фосфолипидов, также контролирует процессы пролиферации и миграции клеток. Ферменты *PLCG1* и *PLCG2* локализуются в цитоплазме клеток и являются частью сигнального комплекса, передающего активирующие сигналы в пределах цитоплазмы НК-клеток. Фосфорилированные молекулы *PLCG1* и *PLCG2* инициируют запуск катионами Ca^{2+} дегрануляции цитотоксических клеток [37].

Данные, полученные по уровню экспрессии генов *PLCG1* и *PLCG2*, свидетельствуют в пользу того, что ГМДП-А противоположным образом модулирует экспрессию генов, кодирующих фосфолипазы *Cb* и *Cγ*. Возможно, такая высокодифференцированная лекарственно индуцированная модуляция генной экспрессии и определяет специфику индукции ГМДП-А различных сигнальных механизмов, контролируемых цитотоксические реакции НК-клеток.

ГМДП-А стимулирует экспрессию генов ИФН 1-го типа и их рецептора. Ранее было показано, что ИФН-α необходим для проявления активности НК-клеток [38]. Более того, наличие ИФН-α в микроокружении опухоли оказалось необходимым для терапевтической антиметастатической активности НК-клеток у мышей [39]. Можно полагать, что вызванное ГМДП-А увеличение экспрессии генов ИФН 1-го типа и его рецептора, выявленное в нашей работе, усиливает функциональную активность НК-клеток.

Транскрипция генов *STAT* имеет непосредственное отношение к усилению продукции медиаторов иммунитета, созреванию и выживанию НК-клеток. Так, *STAT6* определяет продукцию Th2-цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 с противовоспалительной активностью, *STAT5A* контролирует процессы созревания НК-клеток и противодействует их гибели, а *STAT2* входит в тримерный комплекс *ISGF3*, способствующий выживанию НК-клеток при вирусной инфекции. Таким образом, ГМДП-А способен усиливать потенциалы выживаемости и противовоспалительной активности НК-клеток человека, что особенно важно при длительном воздействии цитоплазматического стресса и окислительного стресса, которым подвергаются НК-клетки, особенно в период развития таких патологических процессов в организме, как рак, бактериальные, вирусные и паразитарные инфекции, хронические критические состояния.

MAP2K7 и MAP2K4 являются единственными известными киназами, которые непосредственно активируют стресс-активируемые протеинкиназы *c-Jun* (N-концевые киназы MAPK8/JNK1, MAPK9/JNK2 и MAPK10/JNK3). Киназа MAP2K7 специфически активирует JNK, которые, в свою очередь, активируют субстраты, в том числе факторы транскрипции или проапоптотические белки. MAP2K7 необходим для активации JNK, осуществляемой двойным фосфорилирова-

нием JNK по Thr183 и Tyr185 (P-JNK). Обнаруженное стойкое увеличение экспрессии изученных генов сигнального пути MAPK при воздействии ГМДП-А свидетельствует о том, что препарат способен поддерживать MAPK-зависимый сигнальный путь, необходимый для генерации НК-клеток, включая поляризацию цитотоксических гранул, для проявления функциональной активности НК-клеток [40].

Секретируемые и мембраноассоциированные белки, принадлежащие к семействам ФНО и их рецепторам, участвуют в активации клеток врожденного иммунитета, в том числе НК-клеток. Интересно, что повышенная экспрессия генов *TNFRSF9* и *TNFRSF14* была отмечена в НК-клетках пациентов, перенесших трансплантацию почки, после активации низкоаффинных Fc-рецепторов (CD16a) донор-специфическими анти-HLA-антителами [41]. Обнаруженное в нашем исследовании усиление экспрессии этих генов указывает на общность сигнальных путей, инициированных антителами через CD16, и процессов, запускаемых ГМДП-А.

Полученные результаты по изучению эффекта ГМДП-А на транскриптом НК-клеток человека свидетельствует о способности иммуномодулирующего препарата значительно изменять экспрессию многих генов, контролирующих сигнальные пути активации НК-клеток. Совокупность экспериментальных данных позволяет заключить, что ГМДП-А может быть эффективным средством противодействия ранним этапам

онкогенной и вирусной трансформации для пациентов с дефектами клеточного звена иммунитета.

Выводы

1. Инкубация выделенных НК-клеток человека с ГМДП-А *in vitro* приводит к 1,5–2,5-кратному увеличению уровня транскриптов следующих генов, ассоциированных с процессами трансдукции сигналов от рецепторов НК-клеток (в скобках указаны контролируемые генами параметры функционирования клеток):

1) *STAT5A*, *STAT2* (связаны с выживанием НК-клеток);

2) *PLCB1*, *PIK3R1* и *PIK3R3* (связаны с метаболизмом фосфолипидов);

3) *STAT6* (связаны с продукцией противовоспалительных цитокинов);

4) *CRKL*, *VAV-2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, семейство *MAPK*, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14* (связаны с цитотоксическими реакциями НК-клеток).

2. Изменения экспрессии генов *PLCB1* и *CRKL/RAP1A*, индуцированные ГМДП-А в НК-клетках, имитируют эффекты, наблюдаемые при активации НК-клеток цитокинами ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15 или лигандами рецептора NKG2D, соответственно.

3. Профиль сигнальных путей, определяемый по изменению транскриптома НК-клеток под воздействием ГМДП-А, помогает объяснить обнаруженный ранее противоопухолевый эффект препарата [42].

Литература

1. Гурьянова С.В., Хаитов Р.М. Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики). Иммунология. 2020; 41 (2): 174–83.
2. Abramashvili Yu.G., Kolesnikova N.V., Borisova O.Yu., Guryanova S.V. Low molecular weight bioregulator of bacterial origin in condylomatosis therapy optimization. RUDN Journal of Medicine. 2020; 24 (2): 163–7. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-163-167.
3. Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Колесникова Н.В., Лежава Н.Л., Козлов И.Г., Гудима Г.О. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости. Иммунология. 2019; 40 (6): 34–40. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16005.
4. Мещерякова Е.А., Гурьянова С.В., Макаров Е.А., Андроннова Т.М., Иванов В.Т. Структурно-функциональное исследование глюкозаминилмурамоилпептидов. Влияние химической модификации N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамоилдипептида на его иммуномодулирующие свойства *in vivo* и *in vitro*. Биоорганическая химия. 1991; 17: 1157–65.
5. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D. et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. Annu. Rev. 2001; 19: 197–223.
6. Pesce S., Greppi M., Grossi F., Del Zotto G. et al. PD-1/PD-Ls checkpoint: insight on the potential role of NK cells. Front. Immunol. 2019; 10: 1242.
7. Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Romagnani C. et al. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. Eur. J. Immunol. 2004; 34 (6): 1715–22.
8. Dotiwala F., Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. Curr. Opin. Immunol. 2019; 60: 19–29.
9. Zheng P., Hanson C., Liu D. Adaptor protein Crk-like (CrkL) controls natural killer cell function via regulating the accumulation of activating receptors and phosphorylated Vav-1 molecules at immunological synapses (INM2P.433). J. Immunol. 2014; 192 (1 Suppl.): 56.16.
10. Pugh J.L., Nemat-Gorgani N., Norman P.J., Guethlein L.A. et al. Human natural killer cells downregulate Zap70 and syk in response to prolonged activation or DNA damage. J. Immunol. 2018; 200 (3): 1146–58. DOI: 10.4049/jimmunol.1700542.
11. Kotelevets L., Chastre E. Rac1 signaling: from intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis. Cancers (Basel). 2020; 12 (3). pii: E665. DOI: 10.3390/cancers12030665.
12. Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. Exp. Cell. Res. 2013; 319 (15): 2323–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.04.009.
13. Pearce A.C., Senis Y.A., Billadeau D.D., Turner M. et al. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. J. Biol. Chem. 2004; 279 (52): 53 955–62.
14. Kerr W.G., Colucci F. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. J. Innate Immun. 2011; 3: 249–57.
15. Gulluni F., De Santis M.C., Margaria J.P., Martini M. et al. Class II PI3K functions in cell biology and disease. Trends Cell Biol. 2019; 29 (4): 339–59. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.01.001.
16. Moon W.Y., Powis S.J. Does natural killer cell deficiency (NKD) increase the risk of cancer? NKD may increase the risk of some virus induced cancer. Front. Immunol. 2019; 10: 1703. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01703.
17. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. Associations between functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. Pharmacogenomics. 2016; 13: 1465–77. DOI: 10.2217/pgs.16.27.
18. Osterlund P.I., Pietilä T.E., Veckman V., Kotenko S.V. et al. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-λ) genes. J. Immunol. 2007; 179 (6): 3434–42. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3434.
19. Rogovskii V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer. Curr. Cancer

Drug Targets. 2017; 17 (4): 325–32. DOI: 10.2174/1568009617666170109110816.

20. Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M. et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem. J.* 2005; 392 (2): 249–61. DOI: 10.1042/BJ20050908.

21. Wallach D. The TNF cytokine family: one track in a road paved by many. *Cytokine.* 2013; 63 (3): 225–9. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.05.027.

22. Jewett A., Kos J., Fong Y., Ko M.W. et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2018; 53: 178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.001.

23. Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P., Sorokina I.B., Ivanov V.T. Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(1→4)-N-acetylmuramyl disaccharide unit. *Bioorg. Khim.* 1981; 7: 1843–58.

24. Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курьлева О.М., Саломатина Л.А., Гурьянова С.В., Борисова О.Ю., Гудима Г.О., Севастьянов В.И. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Иммунология.* 2020; 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82.

25. Liu D. The adaptor protein Crk in immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92: 80–9.

26. Liu D., Peterson M.E., Long E.O. The adaptor protein Crk controls activation and inhibition of natural killer cells. *Immunity.* 2012; 36: 600–11.

27. Гапонов А.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Писарев В.М., Александров И.А., Андронина Т.М., Козлов И.Г. Производное мурамилдипептида (ГМДП-А) стимулирует цитотоксичность, экспрессию генов перфорина и рецептора ИЛ-18 НК-клеток. *Иммунология.* 2019; 40 (5): 44–51.

28. Connell N.T., Berliner N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood.* 2019; 133 (19): 2027–30. DOI: 10.1182/blood-2018-11-852491.

29. Colucci F., Schweighoffer E., Tomasello E., Turner M. et al. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 288–94.

30. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L. et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.

31. Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Ковков Е.А., Андронина Т.М. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лече-

нии atopических заболеваний. *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (1): 15–20.

32. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylnsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.

33. Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии.* 2017; 629 (4): 174–8.

34. Segovis C.M., Schoon R.A., Dick C.J., Nacusi L.P., Leibson P.J., Billadeau D.D. PI3K links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion, polarity, and granule secretion. *J. Immunol.* 2009; 182 (11): 6933–42. DOI: 10.4049/jimmunol.0803840.

35. Cocco L., Gilmour R.S., Ognibene A., Manzoli F.A., Irvine R.F. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for phosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 1987; 248: 765–70.

36. Ponti C., Falconi M., Billi A.M., Faenza I. et al. IL-12 and IL-15 induce activation of nuclear PLCbeta in human natural killer cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 20 (1): 149–53.

37. Matalon O., Fried S., Ben-Shmuel A., Pauker M.H., Joseph N., Keizer D. et al. Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C-g by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Sci. Signal.* 2016; 9: ra54.

38. Comet N.R., Aguiló J.I., Rathoré M.G., Catalán E. et al. IFN α signaling through PKC- θ is essential for antitumor NK cell function. *Oncoimmunology.* 2014; 3 (8): e948705. DOI: 10.4161/21624011.2014.948705.

39. Takehara T., Uemura A., Tatsumi T., Suzuki T., Kimura R., Shiotani A., Ohkawa K., Kanto T., Hiramatsu N., Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFNalpha gene to mice. *Int. J. Cancer.* 2007; 120 (6): 1252–60. DOI: 10.1002/ijc.22152.

40. Li C., Ge B., Nicotra M., Stern J.N.H. et al. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (8): 3017–22. DOI: 10.1073/pnas.0712310105.

41. Parkes M.D., Halloran P.F., Hidalgo L.G. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation.* 2017; 101 (4): e102–11. DOI: 10.1097/TP.0000000000001586.

42. Гапонов А.М., Якушенко Е.В., Тутельян А.В., Козлов И.Г. Влияние производного мурамилдипептида (ГМДП-А) на линии опухолевых клеток, экспрессирующих NOD-2. *Российский иммунологический журнал.* 2018; 12 (21): 128–40.

■ References

1. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide – GMDP: mucosal immunotherapy and immunoprophylaxis. *Immunologiya.* 2020; 41 (2): 174–83. (in Russian)

2. Abramashvili Yu.G., Kolesnikova N.V., Borisova O.Yu., Guryanova S.V. Low molecular weight bioregulator of bacterial origin in condylomatosis therapy optimization. *RUDN Journal of Medicine.* 2020; 24 (2): 163–7. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-2-163-167.

3. Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Kolesnikova N.V., Lezhava N.L., Kozlov I.G., Gudima G.O. Effect of muramyl peptide on the microbial landscape of the oral cavity. *Immunologiya.* 2019; 40 (6): 34–40. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-16005. (in Russian)

4. Meshcheryakova E.A., Guryanova S.V., Makarov E.A., Andronova T.M., Ivanov V.T. Structure-function investigation of glucosamuramylpeptides. Influence of chemical modification of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) on its immunomodulatory properties *in vivo* and *in vitro*. *Bioorganicheskaya khimiya.* 1991; 17 (9): 1157–65.

5. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev.* 2001; 19: 197–223.

6. Pesce S., Greppi M., Grossi F., Del Zotto G., et al. PD-1/PD-Ls checkpoint: insight on the potential role of NK cells. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1242.

7. Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Romagnani C., et al. The small subset of CD56brightCD16-natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma

production upon interaction with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34 (6): 1715–22.

8. Dotiwala F., Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. *Curr. Opin. Immunol.* 2019; 60: 19–29.

9. Zheng P., Hanson C., Liu D. Adaptor protein Crk-like (CrkL) controls natural killer cell function via regulating the accumulation of activating receptors and phosphorylated Vav-1 molecules at immunological synapses (INM2P.433). *J. Immunol.* 2014; 192 (1 Suppl): 56.16.

10. Pugh J.L., Nemat-Gorgani N., Norman P.J., Guethlein L.A., et al. Human natural killer cells downregulate Zap70 and syk in response to prolonged activation or DNA damage. *J. Immunol.* 2018; 200 (3): 1146–58. DOI: 10.4049/jimmunol.1700542.

11. Kotelevets L., Chastre E. Rac1 signaling: from intestinal homeostasis to colorectal cancer metastasis. *Cancers (Basel).* 2020; 12 (3). pii: E665. DOI: 10.3390/cancers12030665.

12. Minato N. Rap G protein signal in normal and disordered lymphohematopoiesis. *Exp. Cell. Res.* 2013; 319 (15): 2323–8. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.04.009.

13. Pearce A.C., Senis Y.A., Billadeau D.D., Turner M., et al. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (52): 53 955–62.

14. Kerr W.G., Colucci F. Inositol phospholipid signaling and the biology of natural killer cells. *J. Innate Immun.* 2011; 3: 249–57.

15. Gulluni F., De Santis M.C., Margaria J.P., Martini M., et al. Class II PI3K functions in cell biology and disease. *Trends Cell Biol.* 2019; 29 (4): 339–59. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.01.001.

16. Moon W.Y., Powis S.J. Does natural killer cell deficiency (NKD) increase the risk of cancer? NKD may increase the risk of some virus induced cancer. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1703. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01703.
17. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. Associations between functional FCGR2A R131H and FCGR3A F158V polymorphisms and responsiveness to TNF blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2016; 13: 1465–77. DOI: 10.2217/pgs.16.27.
18. Osterlund P.I., Pietilä T.E., Veckman V., Kotenko S.V., et al. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *J. Immunol.* 2007; 179 (6): 3434–42. DOI: 10.4049/jimmunol.179.6.3434.
19. Rogovskii V.S. The linkage between inflammation and immune tolerance: interfering with inflammation in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2017; 17 (4): 325–32. DOI: 10.2174/1568009617666170109110816.
20. Orton R.J., Sturm O.E., Vyshemirsky V., Calder M., et al. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem. J.* 2005; 392 (2): 249–61. DOI: 10.1042/BJ20050908.
21. Wallach D. The TNF cytokine family: one track in a road paved by many. *Cytokine.* 2013; 63 (3): 225–9. DOI: 10.1016/j.cyt.2013.05.027.
22. Jewett A., Kos J., Fong Y., Ko M.W., et al. NK cells shape pancreatic and oral tumor microenvironments; role in inhibition of tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2018; 53: 178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.08.001.
23. Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P., Sorokina I.B., Ivanov V.T. Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl-(1 \rightarrow 4)-N-acetylmuramyl disaccharide unit. *Bioorganicheskaya khimiya.* 1981; 7: 1843–58.
24. Kursakov S.V., Kuznetsova E.G., Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Guryanova S.V., Borisova O.Yu., Gudima G.O., Sevastyanov V.I. Development and validation of a method for glucosaminyl muramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high performance liquid chromatography. *Immunologiya.* 2020; 41 (1): 74–82. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82. (in Russian)
25. Liu D. The adaptor protein Crk in immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92: 80–9.
26. Liu D., Peterson M.E., Long E.O. The adaptor protein Crk controls activation and inhibition of natural killer cells. *Immunity.* 2012; 36: 600–11.
27. Gaponov A.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Pisarev V.M., et al. Muramyl dipeptide derivative (GMDP-A) stimulates NK-cell cytotoxicity, expression of perforin and receptor IL-18. *Immunologiya.* 2019; 40 (5): 44–51. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15005. (in Russian)
28. Connell N.T., Berliner N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood.* 2019; 133 (19): 2027–30. DOI: 10.1182/blood-2018-11-852491.
29. Colucci F., Schweighoffer E., Tomasello E., Turner M., et al. Natural cytotoxicity uncoupled from the Syk and ZAP-70 intracellular kinases. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 288–94.
30. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.
31. Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kokov E.A., Andronova T.M. Clinical and immunological efficiency of muramyl dipeptide in the treatment of atopic diseases. *Meditinskaya immunologiya.* 2016; 18 (1): 15–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-1-15-20 (in Russian)
32. Guryanova S., Udzhukhu V., Kubylnsky A. Pathogenetic therapy of psoriasis by muramyl peptide. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1275. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01275.
33. Manapova E.R., Fazylov V.Ch., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Voprosy virusologii.* 2017; 62 (4): 174–8. (in Russian)
34. Segovis C.M., Schoon R.A., Dick C.J., Nacusi L.P., Leibson P.J., Billadeau D.D. PI3K links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion, polarity, and granule secretion. *J. Immunol.* 2009; 182 (11): 6933–42. DOI: 10.4049/jimmunol.0803840.
35. Cocco L., Gilmour R.S., Ognibene A., Manzoli F.A., Irvine R.F. Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for phosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 1987; 248: 765–70.
36. Ponti C., Falconi M., Billi A.M., Faenza I., et al. IL-12 and IL-15 induce activation of nuclear PLC β in human natural killer cells. *Int. J. Oncol.* 2002; 20 (1): 149–53.
37. Matalon O., Fried S., Ben-Shmuel A., Pauker M.H., Joseph N., Keizer D., et al. Dephosphorylation of the adaptor LAT and phospholipase C-g by SHP-1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Sci. Signal.* 2016; 9: ra54.
38. Comet N.R., Aguiló J.I., Rathoré M.G., Catalán E., et al. IFN α signaling through PKC- θ is essential for antitumor NK cell function. *Oncoimmunology.* 2014; 3 (8): e948705. DOI: 10.4161/21624011.2014.948705.
39. Takehara T., Uemura A., Tatsumi T., Suzuki T., Kimura R., Shiotani A., Ohkawa K., Kanto T., Hiramatsu N., Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int. J. Cancer.* 2007; 120 (6): 1252–60. DOI: 10.1002/ijc.22152.
40. Li C., Ge B., Nicotra M., Stern J.N.H., et al. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (8): 3017–22. DOI: 10.1073/pnas.0712310105.
41. Parkes M.D., Halloran P.F., Hidalgo L.G. Evidence for CD16a-mediated NK cell stimulation in antibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplantation.* 2017; 101 (4): e102–11. DOI: 10.1097/TP.0000000000001586.
42. Gaponov A.M., Yakushenko E.V., Tutelyan A.V., Kozlov I.G. Influence of muramyl dipeptide derivative (GMDP-A) on NOD-2 expressed tumor cell lines. *Rossiyskiy immunsunologicheskii zhurnal.* 2018; 12 (21): 128–40. (in Russian)

© Тихомирова А.Р., Рулева А.А., 2020

Тихомирова А.Р., Рулева А.А.

Клинико-иммунологическая эффективность отечественного иммуноотропного препарата у детей при острых респираторных инфекциях с бронхообструктивным синдромом

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, 197022, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Резюме

Введение. Частота развития бронхообструктивного синдрома (БОС) на фоне острых респираторных инфекций (ОРИ) у детей раннего возраста остается высокой. У этой группы детей, по данным ранее проведенных исследований, выявлен сниженный иммунный ответ на инфекцию. Таким образом, целесообразно использование иммуномодулирующей терапии у детей с бронхообструктивным синдромом при ОРИ.

Цель исследования – оценить клиническую и иммунологическую эффективность применения препарата альфа-глутамил-триптофан спрей у детей с БОС при ОРИ.

Материал и методы. В статье представлены результаты рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования применения препарата альфа-глутамил-триптофан спрей у детей с БОС при ОРИ, проведенного в инфекционно-пульмонологическом отделении СПб ГБУЗ «ДГБ Св. Ольги» с разрешения этического комитета ДГБ. В исследовании приняли участие дети в возрасте до 6 лет с наличием 2 и более эпизодов БОС на фоне ОРИ. Альфа-глутамил-триптофан назначали после купирования острой картины заболевания в течение 5 дней в виде спрея в дозе 25 мкг детям до 3 лет и 50 мкг – старше 3 лет. Клиническую эффективность оценивали на основании сравнения исходных клинико-anamnestических данных с данными катамнеза через 6 мес после терапии. Критериями оценки были частота и особенности течения ОРИ и БОС, количество госпитализаций. Иммунологическое исследование проводили дважды: в острый период заболевания и не ранее 18-го дня после приема препарата или плацебо. Определялось абсолютное и относительное количество лимфоцитов и их субпопуляций CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (Т-лимфоциты); CD19⁺ (В-лимфоциты). Также оценивались функциональная активность полиморфно-ядерных нейтрофилов, фагоцитарный показатель и фагоцитарное число, показатель завершенности фагоцитоза.

Результаты. Использование альфа-глутамил-триптофана интраназально в виде спрея в комплексной терапии детей с БОС приводило к сокращению частоты и длительности заболеваний ОРИ, способствовало уменьшению эпизодов БОС на фоне ОРИ и улучшению иммунологических параметров, заключающихся в нормализации уровня CD4⁺-Т-клеток, нормализации соотношения CD4⁺/CD8⁺, снижению уровня провоспалительного цитокина ФНО α .

Заключение. Выявлено положительное влияние препарата на частоту, тяжесть и длительность ОРИ у детей с БОС. Благоприятные изменения иммунологических показателей позволяют использовать альфа-глутамил-триптофан спрей в комплексной терапии ОРИ у детей с БОС и для профилактики их рецидивирующего течения.

Ключевые слова: дети; острые респираторные инфекции; бронхообструктивный синдром; альфа-глутамил-триптофан; клиническая эффективность; иммунологическая эффективность

Статья поступила 17.01.2020. Принята в печать 20.04.2020.

Для цитирования: Тихомирова А.Р., Рулева А.А. Клинико-иммунологическая эффективность отечественного иммуноотропного препарата у детей при острых респираторных инфекциях с бронхообструктивным синдромом. Иммунология. 2020; 41 (3): 249–255. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-249-255

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Тихомирова Анна Романовна –
кандидат медицинских наук,
врач педиатр 1-го дифференциально-
диагностического отделения
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России,
Санкт-Петербург,
Российская Федерация
E-mail: tikhomirova@mail.ru

Tikhomirova A.R., Ruleva A.A.

Clinical and immunological effectiveness of an immunotropic drug in children with acute respiratory infections with bronchial obstructive syndrome

Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases of Federal Medico-Biological Agency, 197022, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract

Introduction. The incidence of bronchial obstructive syndrome (BOS) against the background of acute respiratory infections (ARI) in young children remains high. This group of children, according to previous studies, revealed a reduced immune response to infection. Thus, it is advisable to use immunomodulating therapy in children with bronchial obstructive syndrome in ARI.

Aim of the study – to evaluate the clinical and immunological effectiveness of the use of the drug alpha-glutamyl-tryptophan spray in children with bronchial obstructive syndrome in acute respiratory infections.

Material and methods. The article presents the results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study conducted in the infectious-pulmonological department of the St. Petersburg Children's Hospital. The study involved children under the age of 6 years with the presence of 2 or more episodes of biofeedback on the background of ARI. Alpha-glutamyl-tryptophan was prescribed after stopping the acute picture of the disease for 5 days in the form of a spray at a dose of 25 µg for children under 3 years old and 50 µg for older than 3 years. Clinical efficacy was assessed by comparing baseline clinical history data with follow-up data 6 months after therapy. The evaluation criteria were the frequency and characteristics of the course of acute respiratory infections and biofeedback, the number of hospitalizations. An immunological study was carried out twice: in the acute period of the disease and not earlier than the 18th day after taking the drug or placebo. The absolute and relative number of lymphocytes and their subpopulations CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (T-lymphocytes), CD19⁺ (B-lymphocytes) were determined. Functional activity of polymorphonuclear neutrophils, phagocytic index (AF) and phagocytic number (PS), phagocytosis completion index (PZF) were estimated.

Results. The use of alpha-glutamyl-tryptophan intranasally in the form of a spray in the complex treatment of children with biofeedback led to a reduction in the frequency and duration of acute respiratory infections, helped to reduce the number of episodes of biofeedback against ARI and improved immunological parameters that normalize CD4⁺-T-cells level, normalize the CD4⁺/CD8⁺ ratio, a decrease in the level of pro-inflammatory cytokine TNFα.

Conclusion. Identified positive effects of the drug on the frequency, severity and duration of ARI in children with biofeedback. Favorable changes in immunological parameters allow the use of alpha-glutamyl-tryptophan spray in the treatment of ARI in children with biofeedback and for the prevention of their recurrent course.

Keywords: children; acute respiratory infections; bronchial obstructive syndrome; alpha-glutamyl-tryptophan; clinical efficacy; immunological effectiveness

Received 17.01.2020. Accepted 20.04.2020.

For citation: Tikhomirova A.R., Ruleva A.A. Clinical and immunological effectiveness of an immunotropic drug in children with acute respiratory infections with bronchial obstructive syndrome. *Immunologiya*. 2019; 41 (3): 249–55. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-249-255 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Бронхообструктивный синдром (БОС) на протяжении многих лет остается актуальной проблемой педиатрии. Отмечается увеличение его доли в нозологической структуре [1]. БОС у детей наиболее часто развивается

на фоне респираторной инфекции при остром обструктивном бронхите, бронхиолите или является приступом бронхиальной астмы (БА) [2–4]. Чаще всего БОС развивается у детей в возрасте до 5–6 лет.

Возникновению и рецидивированию БОС у детей раннего возраста, помимо возрастных особенностей

For correspondence

Anna R. Tikhomirova –
PhD, Physician Pediatricist,
1st Differential Diagnostics Department,
Pediatric Research and Clinical Center
for Infectious Diseases,
FMBA of Russia,
St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: tikhomirova@mail.ru

строения органов дыхания, способствует целый ряд факторов. Среди них выделяют фоновые состояния (рахит, дистрофии, гиперплазия вилочковой железы), большое количество контактов с инфекционными агентами, неблагоприятную экологию [3, 4]. Согласно данным одного из опубликованных опросов, более половины (72 %) детей с острым обструктивным бронхитом имеют аллергическую отягощенность семейного анамнеза [5]. Эти же факторы способствуют формированию транзиторной иммунной недостаточности, повышению частоты заболеваний острыми респираторными инфекциями (ОРИ) и их длительному течению [6]. Хорошо изучена ассоциация ОРИ с развитием и обострениями БА. В многочисленных исследованиях показана четкая корреляция между перенесенной в младенчестве респираторно-синцитиальной, риновирусной инфекцией и повышенным риском развития БА, при этом у детей с диагностированной БА 85 % обострений связано с эпизодами ОРИ [7].

Детей с повторными БОС, с точки зрения особенностей иммунного ответа, можно считать иммунокомпromетированными. При исследовании иммунного статуса у этой группы детей выявляют различные нестойкие изменения в виде снижения продукции интерферона- γ (ИФН- γ), секреторного и сывороточного IgA, дизиммуноглобулинемии, нарушения фагоцитарных функций, дисфункции клеточного звена иммунитета [6, 8]. В исследованиях, касающихся изучения иммунного ответа у детей с БОС на фоне ОРИ, отмечен сниженный иммунный ответ на инфекцию [3, 9]. Кроме того, некоторые микроорганизмы (вирусы, атипичные возбудители) сами изменяют иммунный ответ ребенка, увеличивая продукцию IgE, интерлейкинов (ИЛ) -4 и -5, фактора некроза опухоли (ФНО), при этом также уменьшая способность к синтезу ИФН- γ и функциональную активность фагоцитов [10].

Нарушения иммунного ответа у детей, страдающих БА, обусловлены в первую очередь патогенезом данного заболевания. В связи с тем, что у детей с БА превалирует atopическая форма, изменения иммунного статуса связаны с преобладанием Th-2 иммунного ответа [4]. Превалирование T-клеток-хелперов 2-го типа (Th2) обеспечивает преимущественную дифференцировку B-лимфоцитов в IgE-продуцирующие клетки, снижение интенсивности образования ИФН и его физиологического ингибирующего действия на синтез IgE, приводящих к гиперпродукции последнего [13]. Перечисленные особенности иммунного ответа, касающиеся детей с частыми острыми респираторными заболеваниями, в том числе с БОС и atopией, а также БА, обуславливают целесообразность применения иммуномодулирующих препаратов с целью повышения эффективности лечения, профилактики осложненного и рецидивирующего течения острых респираторных инфекций и БОС.

Ряд исследований с применением различных противовирусных препаратов с иммуномодулирующей активностью демонстрирует, что применение иммуномодулятора в комплексной терапии рецидивирующего БОС

у детей позволяет оптимизировать некоторые показатели иммунного статуса. В частности, при применении отечественного препарата, представляющего собой комплекс антител к гистамину, CD4-клеткам и человеческому ИФА- γ вызывал достоверное повышение количества NK-клеток, T-лимфоцитов и B-лимфоцитов в сыворотке крови, показателя CD4⁺/CD8⁺ и снижение уровня CD8⁺-T-лимфоцитов с маркером по отношению к группе сравнения [11]. Использование азоксимера бромида у детей с БА и рецидивирующим бронхитом сопровождалось повышением активности фагоцитоза нейтрофилов [5]. Назначение рекомбинантного интерферона- α 2b (рИФН- α 2b) способствовало подавлению репликации респираторных вирусов, поляризации регуляции иммунного ответа по Th1-типу, положительной динамике показателей эффекторного клеточного и гуморального иммунного ответа, сокращению продолжительности симптомов заболевания [13].

Одним из препаратов, способствующих повышению противовирусной защиты, является альфа-глутамил-триптофан (основа препарата Тимоген®). По химической природе это синтетический дипептид, он имеет низкий риск индукции аллергических реакций, что дает возможность использования его у детей с аллергическими заболеваниями. Современные данные изучения механизмов противовирусной и иммуномодулирующей активности альфа-глутамил-триптофана дали основание полагать, что эти эффекты связаны с активацией группы генов TLR/RLR-сигнальных путей врожденного и адаптивного иммунитета и дифференцировкой предшественников гемопоэтических стволовых клеток [14].

В ранее проведенных клинических исследованиях было показано, что применение альфа-глутамил-триптофана приводит к нормализации иммунологических параметров, снижению частоты и продолжительности ОРИ, уменьшению количества эпизодов бронхиальной обструкции у детей с частыми ОРИ, острыми простыми бронхитами, острыми обструктивными бронхитами и БА [15]. Рандомизированные плацебо-контролируемые исследования у детей с острым обструктивным бронхитом и БА ранее не проводили.

Цель настоящего исследования – оценить клиническую и иммунологическую эффективность препарата альфа-глутамил-триптофан в лекарственной форме спрея у детей с БОС при ОРИ.

Материал и методы

Исследование проводили в инфекционно-пульмонологическом отделении СПб ГБУЗ «ДГБ Св. Ольги» с разрешения этического комитета ДГБ. *Критериями включения* в исследование было наличие 2 и более эпизодов БОС на фоне ОРИ, а также возраст до 6 лет. Из исследования *исключали* пациентов, получающих длительное лечение системными кортикостероидами, а также с аутоиммунными и первичными иммунодефицитными заболеваниями. *Дизайн исследования*: рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование.

После купирования острой картины заболевания, симптомов БОС и при нормализации температуры тела больным назначали иммуномодулирующий препарат, являющийся аналогом дипептида тимуса, альфа-глутамил-триптофан в виде назального спрея, который вводился 1 раз в сутки в течение 5 дней в дозе 25 мкг детям до 3 лет и 50 мкг детям старше 3 лет. Назначение препарата было дополнительным к основной схеме лечения. Пациенты с обструктивным бронхитом получали также бронхолитики, по показаниям – мукоактивные препараты, антибактериальную и/или противовирусную терапию. Для купирования приступа БА на фоне ОРИ аналогично применяли вышеперечисленные препараты. Кроме того, пациентам с БА назначали базисную терапию в соответствии с международными протоколами лечения в зависимости от степени тяжести заболевания.

Для оценки клинической эффективности иммуномодулирующей терапии анализировали исходные клинико-anamnestические данные, а через 6 мес после терапии – данные катамнеза. Выяснялись частота и особенности течения ОРИ (температурная реакция, выраженность интоксикации, катаральные явления, наличие осложнений, потребность в антибактериальной терапии), частота и характер БОС (провокация приступов, время возникновения), количество госпитализаций по поводу ОРИ и/или БОС.

Для лабораторной оценки эффективности альфа-глутамил-триптофана проводили двукратное иммунологическое исследование. Первое выполняли в острый период заболевания, не позднее 4-х суток госпитализации, повторное – не ранее 18-го дня после приема дипептида или плацебо. Иммунологическое исследование проведено с помощью моноклональных антител и включало определение абсолютного и относительного количества лимфоцитов и их субпопуляций: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ (Т-лимфоциты); CD19⁺ (В-лимфоциты), CD56⁺ (НК-клетки), CD95⁺ (апоптотические клетки).

Уровень иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG в сыворотке крови исследовали по общепринятым методикам. Циркулирующие иммунные комплексы средней молекулярной массы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом. Неспецифическую защиту оценивали при помощи определения числа НК-клеток, исследования функциональной активности полиморфноядерных нейтрофилов с помощью НСТ-теста, а также определения фагоцитарного показателя

(ФП), фагоцитарного числа (ФЧ) и показателя завершенности фагоцитоза (ПЗФ).

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 12.0. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты

В двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании приняли участие 86 детей от 4 мес до 6 лет, которых госпитализировали с БОС на фоне ОРИ. Среди них 62 ребенка с установленным диагнозом БА и 24 ребенка с рецидивирующими обструктивными бронхитами (РОБ). Средний возраст и распределение пациентов по полу представлены в табл. 1.

Группы пациентов, получивших альфа-глутамил-триптофан или плацебо, являлись однородными по тяжести течения ОРИ. Тяжесть течения ОРИ оценивали по степени выраженности основных симптомов (лихорадка, интоксикация, катаральные явления) в баллах от 1–3.

При оценке клинической эффективности применения препарата было выявлено, что хотя бы один раз ОРИ переболели 68 (79,1 %) детей из 86 обследуемых. Среди них по результатам 6-месячного наблюдения перенесли ОРИ: 34 (75,6 %) пациентов, принимавших дипептид, и 34 (82,9 %) – плацебо. При этом у пациентов, получивших альфа-глутамил-триптофан, частота ОРИ была ниже, чем у детей из группы реципиентов плацебо. Частота ОРИ у детей, принимавших альфа-глутамил-триптофан, составила $1,56 \pm 0,13$ раз, у детей, получавших плацебо – $2,12 \pm 0,19$ раза за 6 мес ($p < 0,05$).

У детей, получивших иммуностропную терапию, реже возникало затяжное течение ОРИ более 7 дней. Также у больных из группы реципиентов альфа-глутамил-триптофана по сравнению с детьми, получившими плацебо, была ниже частота осложненного течения ОРИ (гнойный отит, синусит, пневмония) и реже применялась антибактериальная терапия за 6-месячный период наблюдения (см. рисунок). Получение пациентами иммуностропного препарата ассоциировалось со снижением частоты ОРИ ($r^* = -0,34$; $p < 0,01$), осложненным течением ОРИ ($r = -0,57$; $p = 0,02$), получением антибактериальной терапии ($r = -0,39$; $p = 0,02$) за период наблюдения.

Таблица 1. Распределение больных, получивших альфа-глутамил-триптофан (дипептид) или плацебо, по возрасту, полу и нозологической форме ($n = 86$)

Группа	Характеристика групп								
	возраст, мес	пол				нозологическая форма			
		мальчики		девочки		БА		РОБ	
	$M \pm m$	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Реципиенты дипептида ($n = 45$)	$36,64 \pm 2,83$	33	73,3	12	26,7	32	71,1	13	28,9
Реципиенты плацебо ($n = 41$)	$35,56 \pm 2,71$	27	65,9	14	34,2	30	73,2	11	26,8

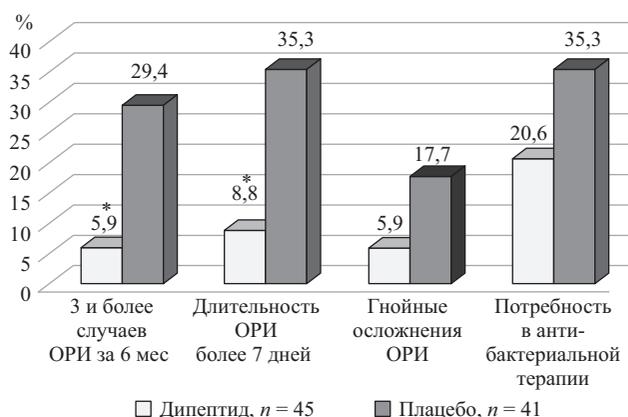
Примечание. БА – бронхиальная астма; РОБ – рецидивирующий обструктивный бронхит.

По тяжести течения ОРИ, оцененной в баллах, по выраженности лихорадки, интоксикации, катарального синдрома не выявлено статистически значимых межгрупповых различий после лечения. Повторные эпизоды БОС в течение 6 мес наблюдения отмечались у 41 (47,7%) участвовавшего в исследовании ребенка: у 20 (44,4 %) детей, получавших альфа-глутамил-триптофан и у 21 (51,2%) пациента, получавшего плацебо ($p > 0,05$). При этом синдром бронхиальной обструкции развивался как на фоне ОРИ, так и под воздействием неинфекционных факторов (контакт с аллергеном, с аэрополлютантами, чрезмерной физической нагрузки).

Развитие БОС на фоне респираторной инфекции в группе детей, получивших альфа-глутамил-триптофан, происходило достоверно реже, чем в группе детей, получивших плацебо. Так, БОС на фоне ОРИ имел место у 9 (45 %) из 20 пациентов с повторными БОС, получившими дипептид, и у 16 (76,2 %) из 21 пациента с повторными БОС, получившими плацебо ($p < 0,05$; критерий χ^2 Пирсона). По количеству эпизодов БОС у одного ребенка и по продолжительности сохранения симптомов бронхиальной обструкции после иммуностропной терапии нами не выявлено статистически значимых межгрупповых различий. Также не отмечено статистически значимых межгрупповых различий в частоте госпитализации после применения иммуностропной терапии. Однако 12,2 % детей из группы реципиентов плацебо нуждались в госпитализации по поводу развившегося ОРИ и/или БОС и только в 6,8 % – в группе реципиентов альфа-глутамил-триптофана.

Двукратное иммунологическое исследование было проведено у 71 (82,6 %) из 86 пациентов, включенных в рандомизированное исследование. У 15 (17,4 %) пациентов не было повторного иммунологического обследования по техническим причинам (отказ родителей от продолжения исследования, заболевание пациента). Исследуемые группы были сопоставимы по нозологическим формам, возрасту и полу.

Группу детей, получавших альфа-глутамил-триптофан, составили 30 (83,33 %) пациентов раннего и млад-



Клинические особенности острых респираторных инфекций (ОРИ) у больных с бронхиальной астмой и рецидивирующим обструктивным бронхитом после иммуностропной терапии
* – $p < 0,05$.

шего возраста и 6 (16,67 %) детей до 1 года. В группу пациентов, получивших плацебо, вошли 32 (93,43 %) ребенка раннего и младшего возраста и 3 (8,57 %) ребенка в возрасте до 1 года.

Анализ эффективности иммуностропной терапии проводился у пациентов раннего и младшего возраста отдельно от грудных детей из-за возрастных особенностей иммунного статуса. Учитывая малую выборку детей грудного возраста ($n = 9$), результаты в данной статье не приводятся.

Группы детей с БОС раннего и младшего возраста до начала лечения были однородны по показателям клеточного иммунного ответа (табл. 2.).

По данным проведенных ранее исследований выявлено, что у детей с рецидивирующим острым обструктивным бронхитом и приступами БА отмечается изначально пониженный уровень $CD4^+$ -Т-клеток и повышенный уровень $CD8^+$ -Т-клеток по сравнению с детьми без БОС [6, 9].

После иммуностропной терапии у детей, получивших альфа-глутамил-триптофан, был выявлен ряд эф-

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета у детей раннего и младшего возраста до и после лечения ($n = 62$), $M \pm m$

Показатель	Обследуемая группа			
	до лечения		после лечения	
	реципиенты дипептида ($n = 30$)	реципиенты плацебо ($n = 32$)	реципиенты дипептида ($n = 30$)	реципиенты плацебо ($n = 32$)
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	10,22 \pm 0,36	10,32 \pm 0,31	8,56 \pm 0,35	8,45 \pm 0,3
Лимфоциты %	41,25 \pm 2,84	43,36 \pm 2,6	48,29 \pm 2,14	52,19 \pm 2,03
Абс $\times 10^9/\text{л}$	4,01 \pm 0,21	4,30 \pm 0,2	4,02 \pm 0,17	4,32 \pm 0,17
$CD3^+$, %	68,96 \pm 0,61	68,29 \pm 0,74	70,41 \pm 0,86	70,27 \pm 0,7
Абс $\times 10^9/\text{л}$	2,82 \pm 0,16	2,94 \pm 0,16	2,78 \pm 0,14	3,05 \pm 0,13
$CD4^+$, %	40,48 \pm 0,57	40,29 \pm 0,8	43,37 \pm 0,85*	40,63 \pm 0,78
Абс $\times 10^9/\text{л}$	1,64 \pm 0,09	1,73 \pm 0,1	1,22 \pm 0,07	1,24 \pm 0,06
$CD8^+$, %	28,11 \pm 0,66	28,14 \pm 0,44	26,89 \pm 0,55*	28,73 \pm 0,51
Абс $\times 10^9/\text{л}$	1,15 \pm 0,08	1,21 \pm 0,07	0,75 \pm 0,04	0,88 \pm 0,04
$CD4^+/CD8^+$	1,47 \pm 0,05	1,45 \pm 0,04	1,64 \pm 0,06**	1,43 \pm 0,04

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 3. Показатели клеточного иммунитета у детей раннего и младшего возраста до и после лечения ($n = 55$), $M \pm m$

Показатель	Обследуемая группа			
	до лечения		после лечения	
	реципиенты дипептида ($n = 27$)	реципиенты плацебо ($n = 28$)	реципиенты дипептида ($n = 27$)	реципиенты плацебо ($n = 28$)
CD19 ⁺ , %	20,41 ± 0,66	21,14 ± 0,59	19,30 ± 0,67	19,57 ± 0,68
Абс × 10 ⁹ /л	0,83 ± 0,05	0,90 ± 0,05	0,53 ± 0,03	0,59 ± 0,03
CD56 ⁺ , %	10,70 ± 0,59	10,64 ± 0,54	10,19 ± 0,54	10,07 ± 0,53
Абс × 10 ⁹ /л	0,43 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,28 ± 0,02	0,31 ± 0,02
CD25 ⁺ , %	10,04 ± 1,08	9,18 ± 0,71	9,40 ± 0,86	11,20 ± 0,81
Абс × 10 ⁹ /л	0,42 ± 0,05	0,40 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,03
CD95 ⁺ , %	9,04 ± 0,86	9,75 ± 0,68	9,68 ± 0,83	10,10 ± 0,76
Абс × 10 ⁹ /л	0,37 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,03
HLA II, %	18,04 ± 0,73	18,43 ± 0,6	16,88 ± 0,7	17,00 ± 0,65
Абс × 10 ⁹ /л	0,74 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,46 ± 0,03	0,51 ± 0,03

фектов по сравнению с детьми, получившими плацебо. В группе больных, получивших дипептид, был отмечен достоверно более высокий уровень Т-хелперов, чем в группе реципиентов плацебо. Содержание относительного количества CD8⁺-Т-клеток в группе реципиентов альфа-глутамил-триптофана было достоверно ниже, чем в группе детей, получивших плацебо. В отношении абсолютного количества CD8⁺-Т-клеток имела место лишь тенденция к достоверности ($p = 0,05$). За счет перечисленных выше изменений у детей с БОС в группе пациентов, получивших альфа-глутамил-триптофан, отмечалось статистически значимое повышение соотношения CD4⁺/CD8⁺ по сравнению с группой реципиентов плацебо (табл. 3). Прием препарата ассоциировался с величиной соотношения CD4⁺/CD8⁺ ($r = 0,4$; $p < 0,001$) чем, вероятно, и объясняется положительный клинический эффект иммуномодулирующей терапии.

В отношении других показателей клеточного иммунитета у детей с БОС, получавших и не получавших альфа-глутамил-триптофан, не выявлено статистически значимых различий после лечения (табл. 3).

Также не выявлено влияния дипептида на функциональную активность Т-лимфоцитов в РТМЛ с конканавалином А, на уровень сывороточных Ig А, М и G и на факторы неспецифической защиты (ФП, ФЧ, ПЗФ, активность полиморфноядерных нейтрофилов в НСТ-тесте) (результаты не представлены).

После курса иммуностропной терапии у пациентов, принимавших альфа-глутамил-триптофан, по сравнению с группой, получившей плацебо, уровень провос-

палительного цитокина ФНОα был достоверно ниже. При этом до начала терапии группы были сопоставимы по содержанию исследуемых цитокинов (табл. 4).

Этот факт подтверждает иммуномодулирующее влияние альфа-глутамил-триптофана. В случае повышенной исходной концентрации цитокинов в крови, в частности ФНОα, под воздействием дипептида происходит снижение их уровня. При относительно низком исходном уровне их концентрация возрастает [8]. По содержанию остальных изучаемых цитокинов периферической крови у детей раннего и среднего возраста после лечения не было выявлено статистически значимых различий.

Обсуждение

Результаты двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования показали положительное влияние альфа-глутамил-триптофана на иммунный статус у детей с БА и РОБ в виде нормализации уровня CD4⁺-Т-клеток, соотношения CD4⁺/CD8⁺, нормализации цитокинового статуса. В клинической картине за время наблюдения после применения иммуностропной терапии у детей с РОБ и БА достоверно снижались частота респираторных инфекций, длительность самого эпизода заболевания и частота развития БОС, связанного с респираторной инфекцией. Влияния препарата на тяжесть течения ОРВИ и бронхиальной обструкции не отмечено. Полученные положительные результаты согласуются с данными ранее проведенных исследований у взрослых с бронхо-

Таблица 4. Характеристика цитокинового статуса после проведения иммуностропной терапии ($n = 28$), $M \pm m$

Цитокины	Обследуемая группа			
	до лечения		после лечения	
	реципиенты дипептида ($n = 16$)	реципиенты плацебо ($n = 12$)	реципиенты дипептида ($n = 16$)	реципиенты плацебо ($n = 12$)
ИЛ-4, пг/мл	12,02 ± 1,77	17,23 ± 2,49	23,23 ± 3,86	32,67 ± 5,84
ИЛ-6, ед/мл	7,04 ± 1,84	4,02 ± 0,86	15,93 ± 2,46	14,11 ± 2,87
ИНФ-γ, пг/мл	59,80 ± 9,30	47,27 ± 6,68	20,27 ± 2,14	23,55 ± 4,19
ФНОα, пг/мл	47,50 ± 5,55	56,17 ± 7,74	15,38 ± 3,24*	26,50 ± 3,43

Примечание. * – $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни).

легочными заболеваниями. При применении препарата альфа-глутамил-триптофан в комплексной терапии бронхолегочных заболеваний у взрослых (бронхит, пневмония, БА) в ряде исследований была показана нормализация иммунологических параметров, в частности уровня CD4⁺-Т-клеток, CD8⁺-Т-клеток и их соотношения, а также сокращение длительности эпизода заболевания [16, 17].

Выводы

1. Использование альфа-глутамил-триптофана в комплексной терапии детей с БОС приводит к сокращению частоты и длительности заболеваний ОРВИ.

Литература

1. Lim V.I., Garifullin L.M., Nabieva Sh.M., Usmanova M.F., Ortikbaeva N.T. The structure of the broncho-obstructive syndrome in hospitalized children. International scientific review of the problems of natural sciences and medicine. In: Collection of Scientific Articles XV International Correspondence Scientific Specialized Conference. 2019: 78–85.
2. Павленко В.А., Мельникова И.М., Мизерницкий Ю.Л. Клинико-диагностические аспекты прогноза бронхиальной астмы у детей раннего возраста. Медицинский совет. 2017; 9: 70–3.
3. Мизерницкий Ю.Л. Дифференциальная диагностика и дифференцированная терапия острой бронхиальной обструкции при ОРВИ у детей раннего возраста. Практическая медицина. 2014; 9 (85): 82–8.
4. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 5-е изд. Москва, 2017.
5. Петрова А.В., Гаймоленко И.Н. Факторы риска развития острой бронхиальной обструкции у детей дошкольного возраста. Забайкальский медицинский вестник. 2019; 1: 70–5.
6. Заплатников А.Л., Гирина А.А. К проблеме «часто болеющих детей». Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2015; 4: 215–20.
7. Мигачева Н.Б., Каганова Т.И., Аронова А.В. Особенности течения острых респираторных инфекций у детей с аллергическими болезнями: проблемы ведения пациентов и пути их решения. Вопросы современной педиатрии. 2013; 12 (2): 78–84.
8. Самсыгина Г.А. Проблема часто болеющих детей в педиатрии. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2015; 4: 211–4.
9. Куртасова Л.М., Шакина Н.А. Особенности иммунного ответа и метаболические изменения лимфоцитов периферической крови у детей раннего

2. Применение дипептида альфа-глутамил-триптофана способствует уменьшению числа эпизодов бронхообструктивного синдрома на фоне ОРВИ.

3. Назначение альфа-глутамил-триптофана в течение 5 дней на фоне ОРВИ способствует улучшению иммунологических параметров, заключающихся в нормализации уровня CD4⁺-Т-клеток, нормализации соотношения CD4⁺/CD8⁺, снижению уровня провоспалительного цитокина ФНОα.

4. Выявленные положительные влияния препарата позволяют рекомендовать альфа-глутамил-триптофан в комплексной терапии ОРВИ у детей с БОС и для профилактики их рецидивирующего течения.

References

1. Lim V.I., Garifullin L.M., Nabieva Sh.M., Usmanova M.F., Ortikbaeva N.T. The structure of the broncho-obstructive syndrome in hospitalized children. International scientific review of the problems of natural sciences and medicine. In: Collection of Scientific Articles XV International Correspondence Scientific Specialized Conference. 2019: 78–85.
2. Pavlenko V.A., Mel'nikova I.M., Mizernitskiy Yu.L. Clinical and diagnostic aspects of the prognosis of bronchial asthma in young children. Meditsinskiy sovet. 2017; 9: 70–3. (in Russian)
3. Mizernitskiy Yu.L. Differential diagnosis and differentiated therapy of acute bronchial obstruction in SARS in young children. Prakticheskaya meditsina. 2014; 9 (85): 82–8. (in Russian)
4. The national program «Bronchial asthma in children. The strategy of treatment and prevention». 5th ed. Moscow, 2017. (in Russian)
5. Petrova A.V., Gaymolenko I.N. Risk factors for development of acute bronchial obstruction in children of preschool age. Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik. 2019; 1: 70–5. (in Russian)
6. Zaplatnikov A.L., Girina A.A. To the problem of «frequently ill children». Pедиатрия. Zhurnal im. G.N. Speranskogo. 2015; 4: 215–20. (in Russian)
7. Migacheva N.B., Kaganova T.I., Aronova A.V. Features of acute respiratory infections in children with allergic diseases: problems of patient management and ways to solve them. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2013; 12 (2): 78–84. (in Russian)
8. Samsygina G.A. Problem of frequently ill children in pediatrics. Pедиатрия. Zhurnal im. G.N. Speranskogo. 2015; 4: 211–4. (in Russian)
9. Kurtasova L.M., Shakina N.A. Features of the immune response and metabolic changes in peripheral blood lymphocytes in young children with recurrent obstructive bronchitis. Meditsinskaya immunologiya. 2017; 19 (5): 597–604. (in Russian)

10. Zaytseva O.V. Acute respiratory infections in children with allergies: problems of choosing an antibacterial drug. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2013; 12 (1): 131–5. (in Russian)
11. Namazova L.S., Botvineva V.V., Voznesenskaya N.I. Modern possibilities of immunotherapy for frequently ill children with allergies. Pедиатricheskaya farmakologiya. 2007; 4 (1): 27–32. (in Russian)
12. Gerasimova N.G., Balashov V.P., Akhverdieveva T.B., Shuvalova Yu.V., Kovalenko E.N., Gorbato V.A. On the role of immunocompetent cells in the course of bronchoobstructive syndrome. Morfologicheskie vedomosti. 2015; 1: 32–6. (in Russian)
13. Simovanyan E.N., Denisenko V.B. Improving the treatment of acute obstructive bronchitis associated with ARVI in young children. Pедиатрия. Zhurnal im. G.N. Speranskogo. 2018; 97 (1): 65–70. (in Russian)
14. Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Burova O.S., Sokolova Z.A. Signalnye TLR/RLR-mekhanizmy immunomoduliruyushchego deystviya preparatov Ingavirin i Timogen. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2019; 18 (1): 60–6. (in Russian)
15. Clinical pharmacology of thymogen. In: V.S. Smirnov (ed.). Saint Petersburg, 2004: 172 p. (in Russian)
16. Litvinova N.V., Ereemeev V.V., Abramova Z.P., et al. Changes in immunological and non-specific reactivity in patients with chronic purulent-obstructive bronchitis in complex treatment with the use of thymogen. Problemy tuberkuleza. 1994; 4: 48–50. (in Russian)
17. Zolodov V.I., Zemskov A.M., Stupnitskiy A.A., Goryaninova T.A. Treatment with thymogen and mielopid of patients with bronchial asthma. Klinicheskaya meditsina. 1995; 73 (6): 43–5. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2020

Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И.

Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) – уникальные средства специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови. Фармакологическое действие препаратов реализуется посредством антирезус Rh₀(D) IgG-антител (Ат) (анти-D-Ат), способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода, попавшие в кровоток матери. Клиническая эффективность препаратов определяется специфической активностью иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) – содержанием анти-D-Ат. Выбор метода оценки специфической активности препаратов играет ключевую роль в обеспечении их потенциальной терапевтической эффективности. Методы автоматизированной гемагглютинации, иммуноферментного анализа и проточной цитофлуориметрии используются в мировой практике для оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D), тогда как в нашей стране указанные методы не внедрены на отечественных производствах иммунобиологических лекарственных средств. В настоящем исследовании проанализированы этапы совершенствования методов оценки специфической активности, особенности их воспроизведения, а также преимущества и недостатки. Установлено, что количественная оценка содержания анти-D-Ат в Международных единицах активности или микрограммах в сравнении с Международным стандартным образцом активности иммуноглобулина антирезус инструментальным методом является необходимым условием получения качественных препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D). В обсуждении приведены полученные на текущий момент знания, по результатам их анализа обоснован вывод о необходимости совершенствования методов оценки специфической активности отечественных препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний. Для поиска литературы использовались базы данных Scopus, Web of Science, Pubmed, WHO, Global Health, elibrary, EMA, FDA, а также Государственная фармакопея Российской Федерации.

Ключевые слова: иммуноглобулин человека антирезус Rh₀(D); современные методы количественной оценки; специфическая активность; фенотип эритроцитов; анти-D-антитела

Статья получена 20.02.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И. Методы оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D): современное состояние проблемы. Иммунология. 2020, 41 (3): 256–261. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Shvedova E.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I.

Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rh₀(D): current status of the problem

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation, 127051, Moscow, Russian Federation

Для корреспонденции
Шведова Евгения Владимировна –
эксперт лаборатории
иммуноглобулинов и препаратов крови
Испытательного центра
экспертизы качества МИБП
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»
Минздрава России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: NovikovaEV@expmed.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>

Abstract

Preparations of immunoglobulin human antirhesus Rh₀(D) are unique means of specific perinatal prevention of Rh-immunization of women with Rh-negative blood affiliation. The pharmacological effect of the drugs is realized by means of antirhesus Rh₀(D) IgG antibodies (Ab) (anti-D-Ab) that can neutralize Rh-positive fetal red blood cells that have entered the mother's bloodstream. The choice of a method for evaluating the specific activity (content of anti-D-Ab) in human immunoglobulin preparations plays a key role in ensuring their potential therapeutic effectiveness. Methods of automatic continuous analysis of hemagglutination, enzyme-linked immunoassay and flow cytofluorimetry are used in the world practice to assess the specific activity of human immunoglobulin antirhesus Rh₀(D), whereas in our country these methods are not implemented in domestic immunobiological drug production. This research analyzes the stages of improvement of methods for evaluating specific activity, features of their reproduction, as well as advantages and disadvantages. Quantitative assessment of the content of anti-D-Ab in International units of activity or micrograms in comparison with the International standard sample of activity of immunoglobulin antirhesus by instrumental method has been established as a necessary condition for obtaining high-quality human immunoglobulin antirhesus Rh₀(D). The discussion provides the knowledge obtained at the moment, as a result, is justified a conclusion about the prospects for improving the methods for evaluating the specific activity of domestic human immunoglobulin antirhesus Rh₀(D) preparations in accordance with modern requirements for bioanalytical methods. Scopus, Web of Science, Pubmed, WHO, Global Health, elibrary, EMA, FDA, and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation were used to search for literature.

Keywords: preparations of Immunoglobulin human antirhesus Rh₀(D); modern methods of quantitative assessment; specific activity; red blood cell phenotype; anti-D-antibodies

Received 20.02.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Shvedova E.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I. Methods for evaluating the specific activity of preparations of human antirhesus Rh₀(D): current status of the problem. *Immunologiya*. 2020, 41 (3): 256–61. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-256-261 (in Russian)

Funding. The study was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590046-9).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Среди иммунологически обусловленных осложнений беременности ведущее место занимает гемолитическая болезнь плода и новорожденного, которая развивается вследствие несовместимости крови матери и плода по различным эритроцитарным антигенам (Аг) [1]. Среди Аг эритроцитов системы резус наиболее иммуногенным является Аг D, способный даже в малых дозах вызывать образование иммунных антител (Ат), которые являются причиной тяжелой гемолитической болезни [2].

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) являются единственными лекарственными средствами, используемыми для специфической перинатальной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови. Они представляют собой концентраты антирезус Rh₀(D) IgG-Ат, полученные из плазмы крови здоровых доноров, иммунизированных D-Аг эритроцитов человека. Фармакологическое действие препаратов реализуется посредством антирезус-Rh₀(D) IgG-Ат (анти-D-Ат), способных нейтрализовать резус-положительные эритро-

циты плода, попавшие в кровоток матери. Клинически подтверждено, что введение рассчитанных доз препарата иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) снижает вероятность развития резус-иммунизации женщин приблизительно в 100 раз [3]. Неадекватная доза введения может привести к анафилактическим реакциям, гемолизу или не сможет обеспечить предотвращение изоиммунизации [4–7]. Таким образом, выбор метода оценки содержания анти-D-Ат в препаратах иммуноглобулинов человека играет ключевую роль в обеспечении их потенциальной терапевтической эффективности.

Цель работы – провести анализ методов оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D), используемых в мировой практике для разработки и внедрения перспективных подходов к количественному определению содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат в препаратах отечественного производства.

Метод гемагглютинации

Структурно анти-D-Ат являются неполными, что в отличие от полных Ат (полимерных молекул иммуно-

For correspondence
Evgeniya V. Shvedova –
Expert of the Laboratory
of Immunoglobulins
and Blood Products
of the Testing Centre
for Evaluation and Control
of Medicinal Immunobiological
Products' Quality,
Scientific Centre
for Expert Evaluation
of Medicinal Products,
Moscow, Russian Federation
E-mail: NovikovaEV@expmed.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>

глобулина изотипа М, некоторых А и G) частично препятствует их визуализации в реакции преципитации [8, 9]. Причинами этого явления может быть экранирование одного из Ag-связывающих центров молекулы иммуноглобулина, а также недостаточное число или малая доступность антигенных детерминант в структуре белка [10, 11]. Поэтому в начале 1960-х годов для оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) был предложен метод непрямой (пассивной) гемагглютинации (непрямая проба Кумбса), основанный на реакции агглютинации резус-положительных эритроцитов, обработанных папаином, и антиглобулиновой сыворотки с анти-D-Аг в препарате. Для воспроизведения метода использовали D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека любого фенотипа [12].

В 1968 г. в результате анализа данных, полученных при использовании указанного метода, было установлено, что титры антирезус Rh₀(D) Ат варьировали в широком диапазоне (до 500 раз) [13]. Поэтому в 1978 г. экспертная комиссия ВОЗ по стандартизации биологических препаратов инициировала глобальные исследования по разработке и аттестации Международного стандартного образца (МСО) содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат с участием 24 лабораторий в 21 стране. Для определения содержания анти-D-Ат в МСО использовали метод изотопной маркировки, который позволил определить количественное содержание анти-D-Ат в микрограммах. Впоследствии МСО были присвоены международные единицы дозы вещества – МЕ (эквиваленты биологической активности). Установлено, что метод непрямой гемагглютинации в сравнении с МСО при параллельных постановках наиболее воспроизводим [14, 15]. В дальнейшем с целью минимизации субъективности оценки результатов, получаемых при использовании реакции гемагглютинации, было предложено применение автоматизированных систем оценки результатов.

При визуальном определении путем сравнения со стандартным образцом, результат оценивают по наличию агглютинации в гемолизате, образованном при добавлении эритроцитов и антиглобулиновой сыворотки в каждое последовательное разведение испытуемого и стандартного образцов. Последнее разведение, в котором наблюдается агглютинация, принимают за титр анти-D-Ат. Если агглютинация эритроцитов наблюдается во всех разведениях исследуемого образца, то титр Ат выше, чем полученные разведения. В этих случаях повторяют титрование, приготовив еще большие разведения исследуемого препарата [16]. При использовании прибора для автоматического анализа регистрируют оптическую плотность гемолизата, полученного в результате реакции гемагглютинации. По результатам измерений разведений стандартного образца строят калибровочный график зависимости значений оптической плотности от содержания анти-D-Ат и в линейном диапазоне определяют специфическую активность испытуемого образца [17].

Метод гемагглютинации имеет ряд существенных недостатков. Субъективная интерпретация результатов при визуальном полуколичественном определении в титрах не позволяет в полной мере охарактеризовать специфическую активность и может помешать адекватному расчету дозы введения. Отсутствие стандартизации фенотипов эритроцитов может влиять на правильность получаемых результатов как при визуальном, так и при автоматизированном контроле, поскольку различные Ag на поверхности клеточной мембраны могут оказывать влияние на связывание с анти-D-Ат. Это связано с неодинаковой экспрессией Ag D у различных индивидов с фенотипами эритроцитов, имеющими в своем составе набор резус-Ag CDe и cDE. В частности, полипептиды Се и се, переплетающиеся в оболочке эритроцита с полипептидами D, затрудняют доступ анти-D-Ат к участкам D-Ag, в результате чего создается видимость слабого реагирования D-положительных эритроцитов с анти-D-сыворотками. При отсутствии полипептидов Се и се в оболочке эритроцитов связыванию D-Ag с анти-D-Ат ничто не мешает, и реакция выглядит более сильной, хотя на тех и на других эритроцитах могло присутствовать одинаковое количество антигенных детерминант [18]. Антиглобулиновая сыворотка, используемая в методе, содержит множество компонентов, среди которых антикомплементарные Ат, в частности к C3d-, C3c-, C4c- и C4d-компонентам комплемента, которые адсорбируются на поверхности эритроцитов и создают видимость положительного результата [19]. Также возможно получение результата отсутствия агглютинации, связанное с низкой аффинностью Ат сыворотки, сенсibiliзирующих эритроциты [20]. Поэтому дальнейшие исследования были направлены на совершенствование количественного определения специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) с использованием более чувствительных и точных инструментальных методов.

Успехи в развитии иммунохимических методов исследований, молекулярно-генетических технологий, в частности создание моноклональных Ат позволили разработать новые специфичные методы, такие как метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) и метод проточной цитофлуориметрии.

Метод конкурентного иммуноферментного анализа

Метод конкурентного ИФА для оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) был предложен S.J. Thorpe и коллегами в 2000 г. [21]. Метод основан на конкуренции меченых биотинилированных моноклональных анти-D-Ат к специфическому эпитопу D с немечеными (исследуемыми) Ат препарата за связывание с D-Ag эритроцитов, адсорбированными на твердой фазе. Количество меченых Ат, присоединившихся к эритроцитам, уменьшится пропорционально содержанию в смеси исследуемых Ат. Связывание с конъюгатом

для последующего выявления присоединившихся Ат достигается за счет использования системы «биотин–авидин–стрептавидин». Молекулы кофермента биотина конъюгируют с моноклональными анти-D-Ат при помощи биотинил-N-гидрохлоридом. Затем биотин связывается с белковым комплексом авидин–стрептавидин, конъюгированным с щелочной фосфатазой. Аффинность связи между авидином и биотином высокая, константа диссоциации лиганда – 10^{-15} М, что обеспечивает высокую стабильность образовавшегося комплекса [22]. Стрептавидин используется для исключения неспецифической сорбции авидина на других молекулах. Конъюгат авидин–стрептавидин прочно фиксируется на комплексе, образованном биотинилированными моноклональными анти-D-Ат и Ат эритроцитов. После добавления субстрата (паранитрофенилфосфата) проводят определение продуктов реакции с использованием спектрофотометра. Для воспроизведения метода используют D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека определенного фенотипа – R2R2, собранные не менее чем от 3 доноров. Значения активности определяют в МЕ в сравнении с МСО содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат человека при построении графика зависимости концентрации и оптической плотности по данным, полученным из серии стандартных растворов. Высокая специфичность метода достигается за счет использования меченых Ат, поскольку конкуренция между ними и исследуемым образцом происходит только за специфический эпитоп D-Аг эритроцитов, что исключает неспецифическое связывание [23]. Высокая чувствительность, воспроизводимость и точность, производительность за счет использования многолуночных полистироловых планшетов, отсутствие зависимости от дорогостоящего оборудования делают метод наиболее универсальным. К недостаткам метода следует отнести высокую стоимость реагентов.

Метод проточной цитофлуориметрии

С начала 2000 г. для количественного определения специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) применяется высокочувствительный инструментальный метод с использованием проточного цитофлуориметра. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции комплекса, образованного специфическим связыванием D-положительных эритроцитов с анти-D-Ат, которые в свою очередь связываются с флуоресцентно-мечеными Ат к антирезус Rh₀(D) IgG-Ат (вторичными антителами) [24]. При этом значения активности получают в МЕ в сравнении с МСО содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат человека при построении графика зависимости логарифма концентрации и интенсивности флуоресценции по данным, полученным из серии стандартных растворов. Для воспроизведения метода используют D-положительные эритроциты I(0) группы крови человека фенотипа R1R1, собранные не менее чем от 3 доноров.

К недостаткам метода можно отнести возможное влияние различных Аг эритроцитов (Аг системы резус С, С^w, а также Аг системы Kell), которые могут создавать эффект интерференции, что может влиять на правильность получаемых результатов [25, 26]. Использование специального дорогостоящего оборудования и реагентов не всегда доступно для некоторых лабораторий, кроме того, предъявляются высокие требования к квалификации персонала [27].

Обсуждение

В первых разработанных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) содержание специфических Ат оценивали в титрах в реакции непрямой (пассивной) гемагглютинации (непрямой пробе Кумбса), что не позволяло количественно оценить содержание антирезус Rh₀(D) IgG-Ат, способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода.

В результате разработки МСО содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат и внедрения современных иммунохимических методов стало возможным проводить оценку специфической активности препаратов иммуноглобулинов антирезус Rh₀(D) количественно в МЕ или в мкг по отношению к МСО (1 мкг = 5 МЕ) [28]. Профилактическую дозу препарата рассчитывают после подсчета количества эритроцитов плода, попавших в кровотоки матери, с использованием лабораторных методов анализа, например, модифицированным методом кислотного вымывания-окрашивания по Кляйхауэру и Бетке [29–31]. Установлено, что 10 мкг (50 МЕ) антирезус Rh₀(D) IgG-Ат нейтрализует 0,5 мл резус-положительных эритроцитов плода (или 1 мл цельной крови) [32]. Для обеспечения правильности и удобства расчета профилактических доз введения содержание специфических Ат в современных препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) может быть 125 мкг (625 МЕ), 150 мкг (750 МЕ), 250 мкг (1250 МЕ), 300 мкг (1500 МЕ).

Методы непрямой гемагглютинации с использованием автоматизированных систем оценки результатов ИФА и проточной цитофлуориметрии для оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) представлены в Европейской фармакопее 9.0. В нашей стране указанные методы отсутствуют в структуре Государственной фармакопеи Российской Федерации и не внедрены на отечественных производствах иммунобиологических лекарственных средств [33].

Таким образом, разработка и внедрение отечественных методик количественного определения содержания антирезус Rh₀(D) IgG-Ат в препаратах иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методам испытаний, является перспективным направлением совершенствования качества указанной группы препаратов крови человека [34, 35].

Заключение

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh₀(D) применяются для специфической перинаталь-

ной профилактики резус-иммунизации женщин с резус-отрицательной принадлежностью крови. Степень реализации фармакологического действия препаратов зависит от содержания в них специфических антирезус $Rh_0(D)$ IgG-Ат (анти-D-Ат), способных нейтрализовать резус-положительные эритроциты плода, попавшие в кровоток матери. Количественное определение содержания анти-D-Ат в МЕ активности или микрограммах в сравнении с МСО активности антирезус-иммуноглобулина инструментальными методами является необходимым условием получения качественных препаратов иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$. Успехи в развитии иммунохимических методов исследований, молекулярно-генетических технологий, в частности создание моноклональных Ат, позволили

разработать в дополнении к традиционно используемому методу гемагглютинации новые альтернативные методы конкурентного ИФА и проточной цитофлуориметрии. В настоящее время специалисты ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России проводят экспериментальные исследования по разработке методик оценки специфической активности препаратов иммуноглобулина человека антирезус $Rh_0(D)$ с целью их внедрения в практику.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Кудашева Е.В., Климов В.И. **Сбор и обработка материала:** Шведова Е.В. **Написание текста:** Шведова Е.В., Кудашева Э.Ю. **Редактирование:** Климов В.И.

■ Литература

1. Савельева Г.М., Курцер М.А., Панина О.Б., Сичинава Л.Г., Клименко П.А., Конопляников А.Г., Алексеенкова М.В. Диагностика, лечение, профилактика гемолитической болезни плода при резус-сенсibilизации. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2006; 6: 73–8.
2. Scott M.L. The complexities of the Rh system. *Vox Sang*. 2004; 87: 58–62.
3. Резус-сенсibilизация. Гемолитическая болезнь плода. Клинические рекомендации. Письмо от 18 мая 2017 г. № 15-4/10/2-3300 МЗ РФ. М., 2017.
4. Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use: EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1 URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003334.pdf.
5. MacKenzie I.Z., Roseman F., Thompson K. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG*. 2006; 113: 96–8.
6. Hannafin B., Lovecchio F., Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Emerg. Med. J*. 2006; 24: 487–90.
7. Connan K. IVIG – is it the answer? Maternal administration of immunoglobulin for severe red cell alloimmunization during pregnancy: a case series. *Obstet. Anesth. Digest*. 2011; 31 (1): 43–5.
8. Поляк Р., Катю Р., Каруш Ф. Иммуноглобулины. Москва : Мир, 1981. 495 с.
9. Фримель Х. Иммунологические методы. Москва : Мир, 1979. 518 с.
10. Givol D., Reisfeld R.A., Mandy W.J. Structural analysis of antibody combining site. In: *Contemporary Topics in Molecular Immunology*. Vol. 2. New York : Plenum Press, 1973: 27–50.
11. Хаитов Р.М. Иммунология : учебник. 2-е изд. Москва : Медицина, 2002: 536 с.
12. Донсков С.И. Группы крови системы Rhesus. Теория и практика. Москва : ВИНИТ и РАН, 2005: 392 с.
13. WHO: 28th report. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Tech. Rep. Ser. 1977; 610: 29–31.
14. Paul E.B. Standardization of US reference Rho(D) immune globulin by quantitative automated hemagglutination. *J. Biol. Stand.* 1986; 14: 121–25.
15. Trope S.J., Sands D., Fox B., Behr-Gross M.-E. A global standard for anti-D immunoglobulin: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Vox Sang*. 2003; 85 (4): 313–21.
16. Herbert W.J. Passive hemagglutination. In: D.M. Weir (ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford; Edinburgh : Blackwell Scientific Publications, 1967.
17. Assay of Human Anti-D Immunoglobulin: European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg : Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe.
18. Донсков С.И. Экспрессия антигена D. В кн.: Группы крови человека : руководство по иммуносерологии. Москва : ИП Скоороходов В.А., 2011: 1016 с.
19. Жибурт Е.Б. Иммунологические основы переливания крови. В кн.: *Трансфузиология : учебник*. Санкт-Петербург : Питер, 2002: 736 с.
20. Trope S.J., Sands D., Rautmann. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2002; 83: 42–9.
21. Trope S.J., Fox B., Turner C. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations. *Transfus. Med*. 2003; 13 (3): 209–12.
22. Dmitriev D.A., Massino Yu.S., Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods*. 2003; 280: 183–99.
23. Trope S.J., Fox B., Sands D. A stable lyophilized reagent for use in a potential reference assay for quantitation of anti-D in immunoglobulin products. *Biologicals*. 2002; 30: 315–21.
24. Schaffner G., Kayser T., Tonjes A. Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2003; 84: 129–36.
25. Austin E.B., McIntosh Y., Hodson C. Anti-D quantitation by flow cytometry: an alternative to the Autoanalyzer? *Transfus. Med*. 1995; 5: 203–10.
26. Дубинкин И.В., Донсков С.И., Пискунова Т.М. Серологическая характеристика моноклональных антител к антигенам Rh-Hr, Kell. В кн.: *Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины : материалы конференции*. Киров, 2005: 156–7.
27. Трусов Г.А., Чапленко А.А., Семенова И.С. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *Биопрепараты*. 2018; 18 (1): 16–4.
28. International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO International Standard for anti-D Immunoglobulin. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/2018.2332 URL: https://www.who.int/biologicals/BS.2018.2332_3rd_IS_ANTI-D.pdf.
29. Манылова Н.А., Логинова И.И. Использование теста Клейхауэра–Бетке для выявления фето-материнской трансфузии и определение факторов риска развития анемии у новорожденных первой недели жизни. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2008; 7 (1): 142–4.
30. Манылова Н.А., Логвинова И.И., Крутских Е.Л., Карамова Л.Н., Гудкова А.Н. Исследование крови родильниц на фетальные эритроциты для диагностики фето-материнских трансфузий. В кн.: *Материалы 2-й научно-практической конференции, посвященной 120-летию родильного дома № 10*. Воронеж, 2008: 42–7.
31. Курцер М.А. Профилактика гемолитической болезни. *Вестник РГМУ*. 2008; 6: 43–7.
32. American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of alloimmunization. *ACOG Pract. Bull*. 2006; 5.
33. Иммуноглобулины человека: ОФС 1.8.1.003.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Том II. URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/1271/index.html.

34. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Biopharmaceutics, May 2018. URL: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

35. Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. Береговых В.В. (ред.). Санкт-Петербург : Профессия, 2017: 768 с.

References

- Savel'eva G.M., Kurtser M.A., Panina O.B., Sichinava L.G., Klimentko P.A., Konoplyannikov A.G., Alekseenkova M.V. Diagnosis, treatment, prevention of fetal hemolytic disease in RH-sensitization. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2006; 6: 73–8. (in Russian)
- Scott M.L. The complexities of the Rh system. *Vox Sang*. 2004; 87: 58–62.
- Rh-sensitization. Hemolytic disease of the fetus. Clinical recommendations. Letter dated 18 May 2017 No. 15-4/10/2-3300 Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow, 2017. (in Russian)
- Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use: EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1 URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003334.pdf.
- MacKenzie I.Z., Roseman F., Thompson K. The kinetics of routine antenatal prophylactic intramuscular injections of polyclonal anti-D immunoglobulin. *BJOG*. 2006; 113: 96–8.
- Hannafin B., Lovecchio F., Blackburn P. Do Rh-negative women with first trimester spontaneous abortions need Rh immune globulin? *Emerg. Med. J*. 2006; 24: 487–90.
- Connan K. IVIG – is it the answer? Maternal administration of immunoglobulin for severe red cell alloimmunization during pregnancy: a case series. *Obstet. Anesth. Digest*. 2011; 31 (1): 43–5.
- Polyak R., Katu R., Karush F. *Immunoglobulins*. Moscow: Mir, 1981: 495 p. (in Russian)
- Frimel' Kh. *Immunological methods*. Moscow: Mir, 1979: 518 p. (in Russian)
- Givol D., Reisfeld R.A., Mandy W.J. Structural analysis of antibody combining site. In: *Contemporary Topics in Molecular Immunology*. Vol. 2. New York: Plenum Press, 1973: 27–50.
- Khaitov R.M. *Immunology: a textbook*. 2nd ed. Moscow: Meditsina, 2002: 536 p. (in Russian)
- Donskov S.I. Blood groups of the Rhesus system. Theory and practice. Moscow: VINIT i RAN, 2005: 392 p. (in Russian)
- WHO: 28th report. Expert Committee on Biological Standardization. WHO Tech. Rep. Ser. 1977; 610: 29–31.
- Paul E.B. Standardization of US reference Rho(D) immune globulin by quantitative automated hemagglutination. *J. Biol. Stand*. 1986; 14: 121–25.
- Trope S.J., Sands D., Fox B., Behr-Gross M.-E. A global standard for anti-D immunoglobulin: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Vox Sang*. 2003; 85 (4): 313–21.
- Herbert W.J. *Passive hemagglutination*. In: D.M. Weir (ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. Oxford; Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1967.
- Assay of Human Anti-D Immunoglobulin: European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe.
- Donskov S.I. D antigen expression. In: *Human Blood Groups: a Guide to Immunoserology*. Moscow: IP Skorokhodov V.A., 2011: 1016 p. (in Russian)
- Zhiburt E.B. *Immunological bases of blood transfusion*. In: *Transfusion: a textbook*. Saint Petersburg: Piter, 2002: 736 p. (in Russian)
- Trope S.J., Sands D., Rautmann. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2002; 83: 42–9.
- Trope S.J., Fox B., Turner C. Competitive enzyme-linked immunoassay of monoclonal immunoglobulin G anti-D preparations. *Transfus. Med*. 2003; 13 (3): 209–12.
- Dmitriev D.A., Massino Yu.S., Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods*. 2003; 280: 183–99.
- Trope S.J., Fox B., Sands D. A stable lyophilized reagent for use in a potential reference assay for quantitation of anti-D in immunoglobulin products. *Biologicals*. 2002; 30: 315–21.
- Schaffner G., Kayser T., Tonjes A. Validation of flow cytometry to quantify the potency of anti-D immunoglobulin preparations. *Vox Sang*. 2003; 84: 129–36.
- Austin E.B., McIntosh Y., Hodson C. Anti-D quantitation by flow cytometry: an alternative to the Autoanalyzer? *Transfus. Med*. 1995; 5: 203–10.
- Dubinkin I.V., Donskov S.I., Piskunova T.M. Serological characteristics of monoclonal antibodies to Rh-Hr and Kell antigens. In: *Materials of Transfusiology and Clinical Medicine Conference*. Kirov, 2005: 156–7. (in Russian)
- Trusov G.A., Chaplenko A.A., Semenova I.S. Use of flow cytometry to quality evaluation of biomedical cell products. *Biopreparaty*. 2018; 18 (1): 16–4. (in Russian)
- International collaborative study to calibrate proposed 3rd WHO International Standard for anti-D Immunoglobulin. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/2018.2332 URL: https://www.who.int/biologicals/BS.2018.2332_3rd_IS_ANTI-D.pdf.
- Manylova N.A., Loginova I.I. Using the Kleihauer-Betke test in revealing of fetomaternal transfusion and determination of risk factors of anemia in newborns of the first week of life. *Systemnyi analys i upravlenie v biomeditsinskikh systemakh*. 2008; 7 (1): 142–4. (in Russian)
- Manylova N.A., Logvinova I.I., Krutskikh E.L., Karanova L.N., Gudkova A.N. The study of the blood of childbirth on fetal red blood cells for the diagnosis fetomaternal transfusion. In: *Materials of the 2nd Scientific and Practical Conference Dedicated to the 120th Anniversary of Voronezh Hospital No. 10*. Voronezh, 2008: 42–7. (in Russian)
- Kurtser M.A. Prevention of hemolytic disease. *Vestnik RGMU*. 2008; 6: 43–7. (in Russian)
- American College of Obstetricians and Gynecologists. Management of alloimmunization. *ACOG Pract. Bull*. 2006; 5.
- Human immunoglobulin: GPA.1.8.1.003.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed. URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/1271/index.html. (in Russian)
- Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Biopharmaceutics, May 2018. URL: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
- ICH guidelines for the pharmaceutical industry. Quality. In: *Beregovykh V.V. (ed.). Saint Petersburg: Professiya, 2017: 768 p. (in Russian)*

© Колесникова Н.В., Самойленко Е.С., 2020

Колесникова Н.В., Самойленко Е.С.

Роль цитокинов в патогенезе инфекционного эндокардита

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 350063, г. Краснодар, Российская Федерация

Резюме

В последние годы не ослабевает интерес к изучению иммунопатогенетической роли цитокинов в формировании различных инфекционно-воспалительных заболеваний. В настоящем обзоре демонстрируется роль цитокинов, вырабатываемых после непосредственного контакта с антигеном. Цитокины нельзя назвать факторами, относящимися исключительно к иммунной системе: осуществляя связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами для вовлечения в регуляцию единой защитной реакции, они играют важную роль в кроветворении, тканевом гомеостазе, межсистемной передаче сигналов. При развитии воспаления цитокины проявляют высокий спектр биологической активности и обеспечивают максимальную эффективность работы тех систем организма, которые требуются в данный момент. В этой связи представляет интерес анализ современных сведений о патогенетической роли цитокинов при инфекционном эндокардите как заболевании инфекционной природы с первичной локализацией возбудителя на клапанах сердца и пристеночном эндокарде, протекающим с возможной генерализацией септического процесса и развитием иммунопатологических проявлений. При поиске информации для обзора использовались базы данных: eLIBRARY, CyberLeninka и Medline (Pubmed).

Ключевые слова: инфекционный эндокардит; бактериальный эндокардит; диагностика; патогенез; цитокины; обзор

Статья получена 01.03.2020. Принята к печати 16.04.2020.

Для цитирования: Колесникова Н.В., Самойленко Е.С. Роль цитокинов в патогенезе инфекционного эндокардита. Иммунология. 2020; 41 (3): 262–268. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-262-268

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Kolesnikova N.V., Samoilenko E.S.

The role of cytokines in the pathogenesis of infective endocarditis

Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russian Federation

Abstract

In recent years the interest in studying of the cytokines' immunopathogenetic role in the various infectious and inflammatory diseases formation has not weakened. Our review demonstrates the role of cytokines, produced after a direct contact with the antigen. Cytokines cannot be called as factors that relate only to the immune system. They connect the immune, nervous, endocrine, hematopoietic and other systems to engage in the regulation of a general protective reaction. Cytokines play an important role in hematopoietic, tissue homeostasis, intersystem signal transmission. With the development of inflammation, cytokines demonstrate a high spectrum of biological activity and provide maximum efficiency of those body systems that are required at the moment. Infective endocarditis (IE), is a disease of infectious nature with the primary localization of the pathogen on the heart valves and parietal endocardium. IE occurs

Для корреспонденции
Колесникова Наталья Владиславовна –
доктор биологических наук,
профессор,
профессор кафедры клинической
иммунологии, аллергологии
и лабораторной диагностики
ФПК и ППС КубГМУ
Минздрава России,
Краснодар, Российская Федерация
E-mail: nvk24071954@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9773-3408>

For correspondence
Natal'ya V. Kolesnikova –
Dr.Sci., Professor,
Professor of the Department
of Clinical Immunology,
Allergology and Laboratory Diagnostics,
Kuban State Medical University
of the Ministry of Healthcare
of the Russian Federation, Krasnodar,
Russian Federation
E-mail: nvk24071954@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9773-3408>

with the possible generalization of the septic process and the development of immunopathological manifestations. In this regard, the analyze of current information about the pathogenetic role of cytokines in infective endocarditis is the subject of interest in modern research. For the literature review used the databases: eLIBRARY, CyberLeninka, and Medline (Pubmed).

Keywords: infective endocarditis; bacterial endocarditis; diagnosis; pathogenesis; cytokines; review

Received 01.03.2020. **Accepted** 16.04.2020.

For citation: Kolesnikova N.V., Samoylenko E.S. The role of cytokines in the pathogenesis of infective endocarditis. *Immunologiya*. 2020; 41 (3): 262–8. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-262-268 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

Введение

В последние годы появилось немало работ, свидетельствующих о роли различных маркеров воспаления при сердечно-сосудистых заболеваниях и, в частности, о взаимосвязях между цитокиновыми маркерами воспаления в сыворотке и показателями структурно-функционального ремоделирования миокарда и дисфункцией эндотелия [1]. В этой связи инфекционный эндокардит (ИЭ) – мультисистемное заболевание, обычно возникающее в результате бактериальной инфекции эндокардиальной поверхности сердца, – сохраняет высокую актуальность, что обусловлено повышенным ростом заболеваемости. Ежегодно в мире регистрируется более 200 тыс. новых случаев ИЭ, тогда как в России ежегодно регистрируется более 10 тыс. случаев ИЭ. Общая заболеваемость ИЭ в мире составляет 46,1 млн. Более выражен рост первичного ИЭ, который неуклонно увеличивается по сравнению со вторичным [2, 3]. Кроме того, в структуре причин смерти от ИЭ отмечено увеличение частоты тромбоэмболических осложнений (ишемический инсульт, инфаркт миокарда и тромбоэмболия легочной артерии), выраженность которых зависит от варианта течения ИЭ: при остром ИЭ преобладает клапанная инфекция с клинической картиной сепсиса, а подострый ИЭ характеризуется преимущественным поражением клапанов и персистирующей септициемией, с развитием выраженной иммунокомплексной патологии (васкулиты, серозиты, гломерулонефрит, миокардит) [4]. Практически любой тип структурного заболевания сердца может приводить к развитию ИЭ, однако в развивающихся странах ревматическая болезнь сердца остается наиболее распространенным предрасполагающим заболеванием сердца для ИЭ [5], а также протезирование сердечных клапанов и кардиоустройства (кардиостимуляторы и имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы) вносят свой вклад в развитие ИЭ [6].

Среди микробных этиологических факторов ИЭ прежде всего следует отметить *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативные стафилококки [7]. Энтерококки являются третьей ведущей причиной ИЭ [8], тогда как доля ИЭ, вызванного стрептококками группы *Virida*, в последние годы существенно снизилась [9]. Чаще всего из-за приема пациентом антибиотиков до диа-

гностического обследования примерно в 10 % случаев ИЭ микроорганизмы при посеве крови не выявляются, тогда как истинный культурально-отрицательный ИЭ может быть вызван микроорганизмами, которые трудно выявить с помощью обычных микробиологических методов, однако серологическое тестирование и полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием биопсии крови или клапанов могут в конечном итоге выявить возбудителя в 60 % таких случаев [10].

В ответ на непрерывную бактериемию при ИЭ наблюдается стимуляция иммунитета, проявляющаяся гипергаммаглобулинемией, цитокинемией и активацией клеточного иммунитета, в связи с чем в настоящее время не ослабевает интерес к изучению иммунопатогенетических аспектов различных вариантов течения ИЭ, характеризующегося появлением новых форм заболевания и полиморфизмом клинической картины. Своевременность диагностики и раннее начало антибактериальной терапии, раннее оперативное вмешательство во многом обуславливают успех лечения пациентов с ИЭ, в связи с чем актуально изучение и внедрение в практику дополнительных иммунологических критериев для лабораторной оценки активности воспалительного процесса, мониторинга терапии и прогнозирования исходов у больных ИЭ.

Цитокины и воспалительный процесс

Синтез и секрецию цитокинов индуцирует непосредственный контакт клеток-продуцентов с антигеном при различных инфекционных процессах, ожогах и других воспалительных процессах, проявляя свои эффекты как на местном, так и на системном уровнях [11]. В первую очередь цитокины регулируют развитие местных защитных реакций в тканях с участием различных типов клеток крови, эндотелия, соединительной ткани и эпителия, путем формирования типичной воспалительной реакции, а также модулируют направленность дифференцировки Th0-лимфоцитов, обеспечивая различные варианты воспалительной реактивности. При этом если вирусная инфекция активирует дифференцировку Т-хелперов в сторону Th1-субпопуляции, то бактериальные антигены обеспечивают формирование Th2-ответа [11].

В зависимости от воздействия на воспалительный процесс цитокины подразделяются на две группы – про-

воспалительные и противовоспалительные, а величина их соотношения в сыворотке крови пациента свидетельствует об активности и выраженности системного воспаления [12].

Цитокины семейства интерлейкина (ИЛ)-1 обеспечивают сигнал тревоги для включения резервных возможностей и перестройки функционирования всех систем организма для борьбы с патогеном. В данном семействе насчитывается 11 молекул: 6 молекул ИЛ-1 (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-1Ra, ИЛ-18, ИЛ-33), играющих фундаментальную роль в развитии многих острых и хронических иммуновоспалительных заболеваний человека [13–15]; 4 изоформы ИЛ-36 (ИЛ-36 α , ИЛ-36 β , ИЛ-36 γ , ИЛ-36Ra), а также ИЛ-37 и ИЛ-38 [16]. При этом ИЛ-1 β интересен тем, что он первым участвует в защитной реакции организма при действии патогенных факторов, а также индуцирует синтез других провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли (ФНО) α и ИЛ-6, низкомолекулярных медиаторов воспаления, хемокинов, экспрессию молекул адгезии на лейкоцитах и эндотелиальных клетках. Спектр действия ИЛ-1 β крайне широк: он инициирует и регулирует воспалительные и иммунные процессы, активирует нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы [12, 17]. ИЛ-1 β играет важную патогенетическую роль не только в развитии заболеваний, но и в поддержании нормального гомеостаза, участвуя в обмене веществ, кроветворении, функции почек и печени и т. д., выполняя важнейшую физиологическую функцию, связанную с формированием противоинфекционного иммунитета, действуя практически на все клетки и органы [15, 16, 18]. Синтез ИЛ-1 в клетках-продуцентах (моноциты/макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы) индуцируется посредством распознавания мембранными Toll-подобными рецепторами (TLR) и цитоплазматическими NOD-подобными рецепторами (NLR) патогенных структур – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) и DAMPs (damage-associated molecular patterns) при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, а также при стрессовых ситуациях и тяжелой физической нагрузке [19].

Рецепторный антагонист ИЛ-1 (ИЛ-1Ra), являющийся противовоспалительным членом семейства ИЛ-1, имеет 30 % гомологии с ИЛ-1 β и, связываясь с рецепторами к ИЛ-1, подавляет его действие и контролирует продукцию и биологическую активность ИЛ-1. ИЛ-1Ra в биологических жидкостях присутствует в концентрации, существенно превышающей уровень ИЛ-1 β , а его эндогенное введение предотвращает или ослабляет опосредованный цитокинами воспалительный каскад [20].

ИЛ-4 является ростовым фактором для базофилов, тучных клеток, эозинофилов, а также одним из основных негативных регуляторов развития реакций клеточного иммунитета, вызываемых Th1-цитокинами. Основными источниками ИЛ-4 являются Th2-клетки, тучные клетки, эозинофилы и базофилы. Цитокин активно участвует в реакциях врожденного и приобретен-

ного иммунитета, осуществляя быстрое и мощное развитие воспалительной реакции [21].

Провоспалительный цитокин ИЛ-6 является одним из медиаторов межклеточного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, продуцируется макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками под влиянием попадающих в организм вирусов, бактерий и их продуктов [22]. Его биологические эффекты связаны с активацией Т- и В-лимфоцитов, с усилением антителогенеза, а также с синтезом и высвобождением белков острой фазы гепатоцитами. Известно, что при хронических воспалительных процессах ИЛ-6 усиливает их клиническую тяжесть, проявляя выраженные провоспалительные свойства, а высокий уровень ИЛ-6 в сыворотке крови отражает усиление выброса бактериальных токсинов, что, в свою очередь, значительно увеличивает продукцию самого ИЛ-6. При остром воспалении ИЛ-6 проявляет иммунорегуляторные и даже противовоспалительные свойства, что объясняется его способностью переводить воспаление из острой фазы в хроническую [22]. Таким образом, ИЛ-6 может переключать развитие защитных реакций от первоначальных воспалительных реакций врожденного иммунитета на адаптивные иммунные реакции.

Наиболее изученный среди провоспалительных хемокинов – ИЛ-8 – относится к СХС-хемокинам (CXCL8). Он продуцируется активированными клетками-продуцентами (моноцитами, макрофагами, эндотелиоцитами, нейтрофилами) при контакте с бактериями, вирусами и продуктами их метаболизма, и является основным активатором и хемоаттрактантом для нейтрофилов, индуцируя их дегрануляцию и трансэндотелиальную миграцию в очаг воспаления [23].

ИЛ-10 – один из ключевых противовоспалительных цитокинов, поскольку он снижает выработку воспалительных молекул, таких как ФНО α и ИЛ-6 [24]. ИЛ-10 синтезируется в основном активированными CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, тучными клетками и моноцитами/макрофагами, является ингибитором клеточного иммунитета, и, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов, предотвращает дифференцировку моноцитов в тканевые макрофаги и апоптоз; усиливает дифференцировку В-клеток в плазматические клетки [11]. Несмотря на подавление кооперации Т- и В-лимфоцитов, в целом ИЛ-10 усиливает функциональную активность В-клеток посредством активации Th2-типа иммунного ответа, повышает цитотоксичность естественных киллеров (ЕК), усиливает продукцию ИЛ-2, ФНО α и интерферона- γ (ИФН- γ), в связи с чем его нельзя считать полностью иммуносупрессивным цитокином.

Провоспалительный цитокин ФНО α секретируется активированными Т-клетками, моноцитами, макрофагами, фибробластами и эндотелиоцитами в ответ на воздействие воспалительных агентов, отвечает за высвобождение других про- и противовоспалительных медиаторов, и тем самым является активным участником противоинфекционного иммунитета на локальном и системном уровне [25].

Известно, что про- и противовоспалительные цитокины контролируют продукцию друг друга: ранние моноцитарные ФНО α и ИЛ-1 аутокринно стимулируют выработку ИЛ-10, который снижает продукцию провоспалительных цитокинов, в том числе собственную. Соотношение уровней про- и противовоспалительных цитокинов наиболее полно отражает направленность иммунной реакции и активность воспаления, поскольку чем больше величина соотношения ИЛ-1 β /ИЛ-10, тем более тяжело протекает воспалительный процесс. Это может быть использовано в качестве критерия определения степени тяжести воспаления при различных патологиях [12].

Роль цитокинов в патогенезе инфекционного эндокардита

Важным звеном патогенеза ИЭ является повреждение эндотелия сердечного клапана и/или пристеночного эндокарда, возникающее в результате воспалительных и дегенеративных изменений. ИЭ зачастую сопровождается развитием иммунопатологических проявлений [26] с выраженными иммунными дисфункциями как локального, так и системного характера. Повреждение эндотелия приводит к запуску каскада патологических процессов с участием про- и противовоспалительных факторов, прогрессирует тканевая гипоксия, возникают глубокие нарушения в системе гемостаза и развивается ДВС-синдром, что в совокупности приводит к необратимым нарушениям функций всех органов и тканей со значимым повышением уровня содержания сывороточных про- и противовоспалительных цитокинов [27, 28]. Так, весьма актуальным является исследование у пациентов с ИЭ сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), который участвует не только в каскаде воспалительных реакций, но и в изменении прокоагулянтной активности, повышении сосудистой проницаемости, а также в пролиферации и дифференцировке эндотелиоцитов [29].

В патогенезе ИЭ происходит сложное взаимодействие бактериальных, эндотелиальных и макрофагальных клеток. Бактерии могут производить множество факторов вирулентности, которые способствуют развитию ИЭ, позволяя патогену проникать в ткани, обходить иммунную систему, прикрепляться к клеткам эндотелия и секретировать экзопротеины и токсины [30]. Относительная устойчивость эндотелия к колонизации бактериями в условиях физиологической нормы во многом обусловлена регуляторными эффектами иммунокомпетентных Т-лимфоцитов, опосредованных секретруемыми ими гуморальными факторами – цитокинами (ИЛ-10, трансформирующий фактор роста – ТФР β), растворимым цитотоксическим Т-лимфоцитарным антигеном, CD25-рецепторами и др. [31]. При этом любое повреждение эндотелия сопровождается прежде всего активацией репаративных процессов с участием внеклеточных матричных белков, тканевых ростовых факторов, фибрина и тром-

боцитов. Однако такая еще небактериальная картина эндотелия является идеальным очагом бактериальной колонизации.

Между тем постоянное или рецидивирующее воспаление, вызванное остаточными септическими вегетациями после антибиотикотерапии, может также привести к повреждению клапана. Так, адсорбция бактерий к эндотелию стимулирует мощный провоспалительный ответ с участием активированных клеток врожденного иммунитета (нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток) и секретруемых ими провоспалительных цитокинов, что может вызвать обширное повреждение ткани [11].

Индукцируемые при ИЭ провоспалительные цитокины включают ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α , ФНО β , ИЛ-8 и хемотаксический пептид моноцитов [32]. При этом ФНО α координирует реакцию цитокинов на повреждение [33], а ИЛ-1 β играет роль ключевого медиатора острой фазы реакции воспаления [16]. Кроме того, обнаружена положительная корреляция между концентрацией ИЛ-10 и клинической тяжестью ИЭ и высокая локальная экспрессия ИЛ-8 в макрофагах в воспаленном эндокарде у пациентов [34]. Антиген-презентирующие клетки – дендритные клетки, моноциты и макрофаги – взаимодействуют с Т- и В-клетками и индуцируют адаптивный иммунный ответ [35] с последующей продукцией иммунорегуляторных и/или эффекторных цитокинов [33]. Некоторые цитокины (ИЛ-1, ИЛ-4, ИФН- γ и ФНО α) необходимы для иницирования и поддержания воспалительного ответа путем дополнительного привлечения лейкоцитов в очаг инфекции и усиления экспрессии лигандов эндотелиальных клеток, тогда как многие хемокины ответственны за активацию и миграцию лейкоцитов в очаг инфекции [15]. Учитывая тот факт, что интенсивность воспаления и разрушения тканей может варьировать в зависимости от вида бактерий, важно отметить, что уровень продукции ИЛ-1 β , ИЛ-12 и ФНО α значительно выше у пациентов с ИЭ, вызванным *S. aureus* по сравнению с ИЭ стрептококковой этиологии [27]. Кроме того, в отличие от стрептококков, *S. aureus* способен проникать в интактные эндотелиальные клетки, вызывая дополнительную колонизацию поврежденного эндотелия, что коррелирует как с более высокой частотой осложнений, так и со смертностью при стафилококковом ИЭ [30].

Известно также, что уровень провоспалительного ФНО α у 100 % пациентов с ИЭ существенно повышается и коррелирует с активностью токсико-инфекционных проявлений (лихорадка, лейкоцитоз, повышением СОЭ), а наиболее высокое его содержание отмечено при ИЭ, вызванном *Staphylococcus* spp., а более низкое – при инфицировании *Enterococcus* spp. и *Corinibacter* [36]. Кроме того, авторами показано, что у больных с иммунокомплексными и тромбоэмболическими осложнениями ИЭ концентрация ФНО α достоверно превышала показатели при неосложненном течении при первичном ИЭ, тогда как при вторичном ИЭ различия оказались недостоверными. Последнее позволяет предполагать прогностическую роль цитокинов перифери-

ческой крови, что отчасти подтверждается данными предоперационного исследования уровней ИЛ-17, ИФН- γ и матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) у пациентов с инфарктом миокарда после стентирования коронарных артерий, позволившем выявить сопряженность увеличения уровней ИЛ-17, ИФН- γ и ММП-9 с повышением риска развития осложнений в ранний послеоперационный период [37]. Учитывая тот факт, что тромбоэмболия является одним из основных осложнений ИЭ, интерес представляют сведения о повышении концентрации ИЛ-10 и ИЛ-17 в плазме крови пациентов с асептическим невазкулитическим тромбозом как в острой, так и в подострой стадиях заболевания, но при этом противовоспалительный цитокин ИЛ-10 способен подавлять провоспалительный эффект ИЛ-17, что необходимо для профилактики дальнейшего повреждения ткани [38].

Наряду с этим имеются данные о снижении содержания ИЛ-6 в плазме крови пациентов с неблагоприятным течением септического осложнения ИЭ по сравнению с благоприятным прогнозом [39, 40], что позволяет считать снижение концентрации ИЛ-6 в плазме крови неблагоприятным прогностическим фактором, свидетельствующим об истощении защитных возможностей иммунитета [41].

Говоря о роли хемокинов в патогенезе ИЭ, следует учесть, что при ИЭ в клапане увеличивается экспрессия мРНК ИЛ-8, RANTES, эотаксина 1, эотаксина 2, экспрессия мРНК их рецепторов, а также усиливается дифференцировка Th0 в Th2, что в целом поддерживает воспалительный процесс в эндокарде. При этом повышение Th2-дифференцировки может свидетельствовать о внеклеточном возбудителе ИЭ, а увеличение продук-

ции хемокинов – об усиленном привлечении цитокин-продуцирующих клеток в очаг воспаления [42].

Заключение

Современные данные о сетевых взаимодействиях в системе цитокинов в норме и при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях, а также сведения о высоком уровне ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО α в сыворотке крови пациентов с ИЭ [30, 35, 43], могут свидетельствовать о роли в патогенезе данного заболевания и о целесообразности их оценки при ИЭ. Поскольку любой сбой в системе цитокинов серьезно затрудняет иммунные реакции хозяина на инфекцию, установление ассоциаций между уровнем цитокинов и клиническим исходом крайне необходимо для раннего выявления осложненного ИЭ. Наряду с этим специфичность цитокиновых профилей при различных внешних воздействиях позволяет использовать их в качестве индикатора эффективности различных методов лечения [22], включая раннее хирургическое вмешательство [44, 45]. Дальнейшее изучение цитокинов других классов позволит получить дополнительную информацию о диагностических критериях воспалительного процесса, о его переходе на системный уровень и о прогнозе, что очень важно для ранней диагностики ИЭ и мониторинга пациентов.

Вклад авторов

Написание и редактирование текста: Колесникова Н.В. **Сбор и анализ литературы, написание и редактирование текста:** Самойленко Е.С.

Литература

1. Гаврилюк Е.В., Конопля А.И., Караулов А.В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертензии. *Иммунология*. 2016; 37 (1): 29–35.
2. Поляков В.П., Николаевский Е.Н., Пичко Г.А. Некоронарогенные и инфекционные заболевания сердца (современные аспекты клиники, диагностики, лечения). Самара, 2010.
3. Виноградова Т.Л. Инфекционный и неинфекционный эндокардиты: современное состояние вопроса. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2010; 6: 8–14.
4. Виноградова Т.Л. Инфекционный эндокардит: современное течение. *Клиницист*. 2011; 3: 4–10. URL: <https://doi.org/10.17650/1818-8338-2011-3-4-9>.
5. Watt G., Lacroix A., Tattevin P., Fournier P.E., Raoult D., Pachirat O. et al. Prospective comparison of infective endocarditis in Khon Kaen, Thailand and Rennes, France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92 (4): 871–4. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0689.
6. Greenspon A.J., Patel J.D., Lau E., Ochoa J.A., Frisch D.R., Ho R.T. et al. 16-year trends in infection burden for pacemakers and implantable cardioverter defibrillators in the United States. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58 (10): 1001–6. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.04.033.
7. Federspiel J.J., Stearns S.C., Peppercorn A.F., Chu V.H., Fowler V.G. Increasing US rates of endocarditis with *Staphylococcus aureus*: 1999–2008. *Arch. Intern. Med.* 2012; 172 (4): 363–5. DOI: 10.1001/archinternmed.2011.1027.
8. Pericás J.M., Zboromyrska Y., Cervera C., Castañeda X., Almeida M., Garcia-de-la-Maria C. et al. Enterococcal endocarditis revisited. *Future Microbiol.* 2015; 10 (7): 1215–40. DOI: 10.2217/fmb.15.46.
9. Duval X., Delahaye F., Alla F., Tattevin P., Obadia J.F., Moing V.L. et al. Temporal trends in infective endocarditis in the context of Prophylaxis Guideline Modifications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59 (22): 1968–76. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.02.029.
10. Fournier P.E., Thuny F., Richet H., Lepidi H., Casalta J.P., Arzouni J.P. et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51 (2): 131–40. DOI: 10.1086/653675.
11. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. Санкт-Петербург: Фолиант, 2008.
12. Стагниева И.В., Симбирцев А.С. Значение цитокинового профиля в проявлении болевого симптома при риносинусите. *Цитокины и воспаление*. 2015; 14 (4): 29–34. DOI: 10.17116/rosrino201725443-47.
13. Schett G., Dayer J.M., Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016; 12 (1): 14–24. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.166.
14. Ильина А.Е., Станислав М.Л., Денисов Л.Н., Насонов Е.Л. Интерлейкин 1 как медиатор воспаления и терапевтическая мишень. *Научно-практическая ревматология*. 2011; 49 (5): 62–71. DOI: 10.14412/1995-4484-2011-1463.
15. Dinarello C.A., Van der Meer J.W.M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin. Immunol.* 2013; 25 (6): 469–84. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.008.
16. Sims J.E., Smith D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (2): 89–102. DOI: 10.1038/nri2691.
17. Полевщиков А.В., Назаров П.Г. Иммунология белков острой фазы воспаления и работы Р.В. Петрова. *Иммунология*. 2020; 41 (2): 167–73. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-167-173.

18. Gabay C., Lamacchia C., Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010; 6 (4): 232–41. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.4.
19. Jimenez-Dalmaroni M.J., Gerswhin M.E., Adamopoulos I.E. The critical role of toll-like receptors – from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 2016; 15 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.08.009.
20. Насонов Е.Л., Елисеев М.С. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека. Научно-практическая ревматология. 2016; 54 (1): 60–77. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-60-77.
21. Yoshimoto T. The hunt for the source of primary interleukin-4: how we discovered that natural killer T cells and basophils determine T helper type 2 cell differentiation in vivo. *Front. Immunol.* 2018; 9: 716. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00716.
22. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал. 2013; 13 (3): 18–41.
23. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Шахманов Д.М., Жданов К.В., Тотолян А.А. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С. Инфекция и иммунитет. 2013; 3 (1): 49–58. DOI: 10.15789/2220-7619-2013-1-49-58.
24. Frencken J.F., Van Vught L.A., Peelen L.M., Ong D.S.Y., Klein Klouwenberg P.M.C., Horn J. et al. An unbalanced inflammatory cytokine response is not associated with mortality following sepsis: a prospective cohort study. *Crit. Care Med.* 2017; 45 (5): 493–9. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002292.
25. Liang Y., Li X., Zhang X., Li Z., Wang L., Sun Y. et al. Elevated levels of plasma TNF-alpha are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-kB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock.* 2014; 41 (4): 275–81. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001116.
26. Данилов А.И., Алексеева И.В., Аснер Т.В., Власова Е.Е., Дроздович Е.Л., Елохина Е.В. и др. Реальная практика диагностики инфекционного эндокардита в РФ: промежуточные результаты исследования МАЭСТРО. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013; 15 (2): 18–9.
27. Nunes M.C.P., Araujo I.R., Carvalho A.T., Andrade L.A., Resende M.H.L., Silva J.L.P. et al. Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? *Adv. Infect. Dis.* 2013; 3 (2): 115–9. DOI: 10.4236/aid.2013.32018.
28. Bustamante J., Arévalo A., Tamayo E., Sarría C., Aguilar-Blanco E.M., Heredia M. et al. Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis. *APMIS.* 2013; 122 (6): 526–9. DOI: 10.1111/apm.12189.
29. Yen P., Finley S.D., Engel Stefanini M.O., Popel A.S. A two compartments model of VEGF distribution in the mouse. *PLoS One.* 2011; 6 (11): e27514. DOI: 10.1371/journal.pone.0027514.
30. Nunes M.C.P., Gelape C.L., Ferrari T.C.A. Profile of infective endocarditis at a tertiary care center in Brazil during a seven-year period: prognostic factors and in-hospital outcome. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14 (5): e394–8. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.06.024.
31. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Ann. Rev. Immunol.* 2012; 30 (1): 531–64. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
32. Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y.M., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26 (3): 422–47. DOI: 10.1128/CMR.00104-12.
33. Schulte W., Bernhagen J., Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets – an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 1–16. DOI: 10.1155/2013/165974.
34. Shun C.T., Yeh C.Y., Chang C.J., Wu S.H., Lien H.T., Chen J.Y. et al. Activation of human valve interstitial cells by viridians streptococci modulin induces chemotaxis of mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 2009; 199 (10): 1488–96. DOI: 10.1086/598485.
35. Courties G., Moskowitz M.A., Nahrendor M. The innate immune system after ischemic injury: lessons to be learned from the heart and brain. *JAMA Neurol.* 2014; 71 (2): 233–6. DOI: 10.1001/jama-neurol.2013.5026.
36. Федорова Т.А., Семенов Н.А., Ташина С.Я., Ройтман А.П., Ким Т.В., Стефаненко Н.И. Маркеры воспаления, их диагностическое и прогностическое значение. Клиническая медицина. 2013; 3: 15–8.
37. Маркелова Е.В., Грачев Н.И., Семенихин А.А., Караулов А.В. Иммунобиохимические предикторы неблагоприятного прогноза у пациентов с острым инфарктом миокарда после коронарного стентирования. Российский иммунологический журнал. 2019; 13 (22): 394–6.
38. Izadi S., Borhani-Hagiga A., Bastani K., Kardeh B., Yadollahi-Khales G., Neydavoodi M. Circulating levels of interleukin-10 and -17 in patients with cerebral sinus venous thrombosis (CSVT) at acute and subacute stages: a prospective case-control study. *Iran. J. Immunol.* 2018; 15 (3): 221–7. DOI: 10.22034/IJI.2018.39391.
39. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A. et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18 (6): 891–7. DOI: 10.1007/s10156-012-0435-2.
40. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A. et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2014; 20 (1): 30–4. DOI: 10.1016/j.jiac.2013.07.005.
41. Moro-Garcia M.A., Echeverria A., Galan-Artimetz M.C., Suarez-Garcia F.M., Solano-Jaurrieta J.J., Avanzas-Fernandez P. et al. Immunosenescence and inflammation characterize chronic heart failure patients with more advanced disease. *Int. J. Cardiol.* 2014; 174 (3): 590–9. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.04.128.
42. Долгих С.В., Сысоев К.А., Жирехина О.В., Давыденко В.В., Тотолян А.А. Исследование хемокинов и рецепторов к ним при инфекционном эндокардите. Медицинская иммунология. 2006; 8 (2–3): 396.
43. Araujo I.R., Ferrari T.C.A., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Junior M.H.G. et al. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One.* 2015; 10 (7): e0133631. DOI: 10.1371/journal.pone.0133631.
44. Thuny F., Beurtheret S., Mancini J., Gariboldi V., Casalta J.P., Riberi A. et al. The timing of surgery influences mortality and morbidity in adults with severe complicated infective endocarditis: a propensity analysis. *Eur. Heart J.* 2011; 32 (16): 2027–33. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp089.
45. Baumgartner H., Falk V., Bax J.J., De Bonis M., Hamm C., Holm P.J. et al. Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38 (36): 2739–91. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx391.

■ References

1. Gavriluyk E.V., Konoplya A.I., Karaulov A.V. The role of immune disorders in the pathogenesis of arterial hypertension. *Immunologia.* 2016; 37 (1): 29–35. (in Russian)
2. Polyakov V.P., Nikolaevskiy E.N., Pichko G.A. Non-coronary and infectious heart diseases (modern aspects of the clinic, diagnosis, treatment). Samara, 2010. (in Russian)
3. Vinogradova T.L. Infective and nonbacterial endocarditis: current status issue. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2010; 6: 8–14. (in Russian)
4. Vinogradova T.L. Infective endocarditis: modern course. *Klinitsist.* 2011; 3: 4–10. URL: <https://doi.org/10.17650/1818-8338-2011-3-4-9>. (in Russian)
5. Watt G., Lacroix A., Tattevin P., Fournier P.E., Raoult D., Pachirat O., et al. Prospective comparison of infectious endocarditis in Khon Kaen, Thailand and Rennes, France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 92 (4): 871–4. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0689.
6. Greenspon A.J., Patel J.D., Lau E., Ochoa J.A., Frisch D.R., Ho R.T., et al. 16-year trends in infection burden for pacemakers and implantable cardioverter defibrillators in the United States. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58 (10): 1001–6. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.04.033.
7. Federspiel J.J., Stearns S.C., Peppercorn A.F., Chu V.H., Fowler V.G. Increasing US rates of endocarditis with *Staphylococcus aureus*: 1999–2008. *Arch. Intern. Med.* 2012; 172 (4): 363–5. DOI: 10.1001/archinternmed.2011.1027.
8. Pericás J.M., Zboromyrska Y., Cervera C., Castañeda X., Almela M., Garcia-de-la-Maria C., et al. Enterococcal endocarditis revisited. *Future Microbiol.* 2015; 10 (7): 1215–40. DOI: 10.2217/fmb.15.46.
9. Duval X., Delahaye F., Alla F., Tattevin P., Obadia J.F., Moing V.L., et al. Temporal trends in infective endocarditis in the context of Prophylaxis Guideline Modifications. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59 (22): 1968–76. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.02.029.

10. Fournier P.E., Thuny F., Richet H., Lepidi H., Casalta J.P., Arzouni J.P., et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51 (2): 131–40. DOI: 10.1086/653675.
11. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. Saint Petersburg: Foliant, 2008. (in Russian).
12. Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S. Role of cytokine profile in manifestation of pain in rhinosinusitis. *Tsitokiny i vospalenie.* 2015; 14 (4): 29–34. DOI: 10.17116/rostrino201725443-47. (in Russian)
13. Schett G., Dayer J.M., Manger B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016; 12 (1): 14–24. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.166.
14. Il'ina A.E., Stanislav M.L., Denisov L.N., Nasonov E.L. Interleukin 1 as an inflammatory mediator and therapeutic target. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2011; 49 (5): 62–71. DOI: 10.14412/1995-4484-2011-1463. (in Russian)
15. Dinarello C.A., Van der Meer J.W.M. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin. Immunol.* 2013; 25 (6): 469–84. DOI: 10.1016/j.smim.2013.10.008.
16. Sims J.E., Smith D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (2): 89–102. DOI: 10.1038/nri2691.
17. Polevshchikov A.V., Nazarov P.G. Immunology of acute phase proteins of inflammation and work of R.V. Petrov. *Immunologiya.* 2020; 41 (2): 167–73. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-167-173. (in Russian)
18. Gabay C., Lamacchia C., Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010; 6 (4): 232–41. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.4.
19. Jimenez-Dalmaroni M.J., Gerswhin M.E., Adamopoulos I.E. The critical role of toll-like receptors – from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. *Autoimmun. Rev.* 2016; 15 (1): 1–8. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.08.009.
20. Nasonov E.L., Eliseev M.S. Role of interleukin 1 in the development of human diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2016; 54 (1): 60–77. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-60-77. (in Russian)
21. Yoshimoto T. The hunt for the source of primary interleukin-4: how we discovered that natural killer T cells and basophils determine T helper type 2 cell differentiation in vivo. *Front. Immunol.* 2018; 9: 716. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00716.
22. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal.* 2013; 13 (3): 18–41. (in Russian)
23. Sysoev K.A., Chukhlov A.B., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolyan A.A. Cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic hepatitis C. *Infektsia i immunitet.* 2013; 3 (1): 49–58. DOI: 10.15789/2220-7619-2013-1-49-58. (in Russian)
24. Frencken J.F., Van Vught L.A., Peelen L.M., Ong D.S.Y., Klein Klouwenberg P.M.C., Horn J., et al. An unbalanced inflammatory cytokine response is not associated with mortality following sepsis: a prospective cohort study. *Crit. Care Med.* 2017; 45 (5): 493–9. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002292.
25. Liang Y., Li X., Zhang X., Li Z., Wang L., Sun Y., et al. Elevated levels of plasma TNF-alpha are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF-kB and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Shock.* 2014; 41 (4): 275–81. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000116.
26. Danilov A.I., Alekseeva I.V., Asner T.V., Vlasova E.E., Drozdovich E.L., Elokhina E.V., et al. Real practice of diagnostics of infectious endocarditis in the Russian Federation: interim results of the MAESTRO study. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2013; 15 (2): 18–9. (in Russian)
27. Nunes M.C.P., Araújo I.R., Carvalho A.T., Andrade L.A., Resende M.H.L., Silva J.L.P., et al. Do cytokines play a role in predicting some features and outcome in infective endocarditis? *Adv. Infect. Dis.* 2013; 3 (2): 115–9. DOI: 10.4236/aid.2013.32018.
28. Bustamante J., Arévalo A., Tamayo E., Sarria C., Aguilar-Blanco E.M., Heredia M., et al. Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis. *APMIS.* 2013; 122 (6): 526–9. DOI: 10.1111/apm.12189.
29. Yen P., Finley S.D., Engel Stefanini M.O., Popel A.S. A two compartments model of VEGF distribution in the mouse. *PLoS One.* 2011; 6 (11): e27514. DOI: 10.1371/journal.pone.0027514.
30. Nunes M.C.P., Gelape C.L., Ferrari T.C.A. Profile of infective endocarditis at a tertiary care center in Brazil during a seven-year period: prognostic factors and in-hospital outcome. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14 (5): e394–8. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.06.024.
31. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Ann. Rev. Immunol.* 2012; 30 (1): 531–64. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
32. Spaulding A.R., Salgado-Pabón W., Kohler P.L., Horswill A.R., Leung D.Y.M., Schlievert P.M. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26 (3): 422–47. DOI: 10.1128/CMR.00104-12.
33. Schulte W., Bernhagen J., Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets – an updated view. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 1–16. DOI: 10.1155/2013/165974.
34. Shun C.T., Yeh C.Y., Chang C.J., Wu S.H., Lien H.T., Chen J.Y., et al. Activation of human valve interstitial cells by a viridid streptococci modulin induces chemotaxis of mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 2009; 199 (10): 1488–96. DOI: 10.1086/598485.
35. Courties G., Moskowitz M.A., Nahrendorf M. The innate immune system after ischemic injury: lessons to be learned from the heart and brain. *JAMA Neurol.* 2014; 71 (2): 233–6. DOI: 10.1001/jama-neurol.2013.5026.
36. Fedorova T.A., Semenenko N.A., Tazina S.Ya., Roytman A.P., Kim T.V., Stefanenko N.I. The markers of inflammation and their diagnostic and prognostic significance under infectious endocarditis. *Klinicheskaya meditsina.* 2013; 3: 15–8. (in Russian)
37. Markelova E.V., Grachev N.I., Semikhin A.A., Karaulov A.V. Immunobiochemical predictors of adverse prognosis in patients with acute myocardial infarction after coronary stenting. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal.* 2019; 13 (22): 394–6. (in Russian)
38. Izadi S., Borhani-Hagiga A., Bastani K., Kardeh B., Yadollahi-Khales G., Neydavoodi M. Circulating levels of interleukin-10 and -17 in patients with cerebral sinovenous thrombosis (CSVT) at acute and subacute stages: a prospective case-control study. *Iran. J. Immunol.* 2018; 15 (3): 221–7. DOI: 10.22034/IJI.2018.39391.
39. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A., et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18 (6): 891–7. DOI: 10.1007/s10156-012-0435-2.
40. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A., et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2014; 20 (1): 30–4. DOI: 10.1016/j.jiac.2013.07.005.
41. Moro-Garcia M.A., Echeverria A., Galan-Artinez M.C., Suarez-Garcia F.M., Solano-Jaurrieta J.J., Avanzas-Fernandez P., et al. Immunosenescence and inflammation characterize chronic heart failure patients with more advanced disease. *Int. J. Cardiol.* 2014; 174 (3): 590–9. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.04.128.
42. Dolgikh S.V., Sysoev K.A., Zhirekhina O.V., Davydenko V.V., Totolyan A.A. Investigation of chemokines and receptors to them in infectious endocarditis. *Meditsinskaya immunologiya.* 2006; 8 (2–3): 396. (in Russian)
43. Araujo I.R., Ferrari T.C.A., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Junior M.H.G., et al. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One.* 2015; 10 (7): e0133631. DOI: 10.1371/journal.pone.0133631.
44. Thuny F., Beurtheret S., Mancini J., Gariboldi V., Casalta J.P., Riberi A., et al. The timing of surgery influences mortality and morbidity in adults with severe complicated infective endocarditis: a propensity analysis. *Eur. Heart J.* 2011; 32 (16): 2027–33. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp089.
45. Baumgartner H., Falk V., Bax J.J., De Bonis M., Hamm C., Holm P.J., et al. Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 2017; 38 (36): 2739–91. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx391.

Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020

Хатамов Х.М.¹, Суяров А.А.¹, Киреев В.В.¹, Зиядуллаев Ш.Х.¹,
Мухторов Ш.М.¹, Алимжанова Л.И.²**Эффективность густого экстракта суммы флавоноидов
в виде мази при лечении контактного аллергического
дерматита в эксперименте**¹ Институт иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, 100060, г. Ташкент, Республика Узбекистан² Ташкентский институт вакцин и сывороток, 100084, г. Ташкент, Республика Узбекистан**Резюме**

Цель работы – исследование специфической активности препарата наружного действия густого экстракта суммы флавоноидов из череды.

Материал и методы. Авторами разработано новое лекарственное средство – густой экстракт суммы флавоноидов в виде мази, получаемых из череды трехраздельной (лат. *Bidens tripartita*), которое использовалось для лечения контактного аллергического дерматита, вызванного 2,4-динитрохлорбензолом в эксперименте у морских свинок.

Результаты исследования показали, что 5 % мазевое лекарственное средство на основе густого экстракта суммы флавоноидов визуальнее более эффективно действовало на воспалительный процесс кожных покровов морских свинок по сравнению 1 и 3 % мазями на основе густого экстракта суммы флавоноидов, антигистаминного средства Псило-Бальзам® и глюкокортикостероидной мази Целестодерм В®.

Заключение. Изучаемые 1, 3 и 5 % мази густого экстракта суммы флавоноидов обладают выраженным действием на экспериментальный контактный дерматит у морских свинок. Наибольшим терапевтическим эффектом обладает 5 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов на местной основе при контактном аллергическом дерматите. При этом индекс уменьшения тяжести кожных проявлений (*Ind*) был наибольшим по сравнению с другими исследуемыми группами – 37,9 %.

Ключевые слова: 1 %, 3 % и 5 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов; экспериментальный контактный аллергический дерматит; 2,4-динитрохлорбензол

Статья поступила 21.11.2019. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Хатамов Х.М., Суяров А.А., Киреев В.В., Зиядуллаев Ш.Х., Мухторов Ш.М., Алимжанова Л.И. Эффективность густого экстракта суммы флавоноидов в виде мази при лечении контактного аллергического дерматита в эксперименте. Иммунология. 2020; 41 (3): 269–273. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-269-273

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Khatamov H.M.¹, Suyarov A.A.¹, Kireev V.V.¹, Ziyadullaev Sh.H.¹,
Muhtorov Sh.M.¹, Alimzhanova L.I.²**Efficiency of a dense extract of the sum of flavonoids
in the form of ointment at treatment contact allergic
dermatitis in experiment**¹ Institute of immunology and human genomics of Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, 100060, Tashkent, Uzbek Republic² Tashkent Institute of Vaccines and Sera, 100084, Tashkent, Uzbek Republic**Abstract**

The aim of research is to study the specific activity of the preparation of external action of a dense extract of the sum of flavonoids from *Bidens tripartitae*.

Для корреспонденции
Хатамов Хайрулла Мусурмонович –
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник
лаборатории иммунофармакологии,
Институт иммунологии
и геномики человека АН РУз,
Ташкент, Республика Узбекистан
E-mail: xabas@rambler.ru

Material and methods. The authors developed and studied a new medical product – a dense extract of the sum of flavonoids in the form of ointment obtained from *Bidens tripartita*, which was used for treatment of contact allergic dermatitis, experimentally induced in guinea pigs by 2,4-dinitrochlorbenzol.

Results of research have shown that 5 % ointment a medical product on the basis of a dense extract of the sum of flavonoids, visually operated on inflammatory process of integuments of porpoises in comparison of 1 % and 3 % with ointments on the basis of a dense extract of the sum of flavonoids, antihistamine drug Psilo-Balsam® and glucocorticoid ointments Celestoderm B® century more effectively.

Conclusions. The studied 1, 3 and 5% ointments of dense extract of the sum of flavonoids have a pronounced effect on experimental contact dermatitis in guinea pigs. The greatest therapeutic effect has a 5 % ointment of a dense extract of the sum of flavonoids on a local basis for contact allergic dermatitis. At the same time the index of reducing the severity of skin manifestations (*Ind*) was the highest compared to other investigated groups – 37.9 %.

Keywords: 1, 3 and 5 % ointment of a dense extract of the sum of flavonoids; experimental contact allergic dermatitis; 2,4-dinitrochlorbenzol

Received 21.11.2019. Accepted 16.04.2020.

For citation: Khatamov H.M., Suyarov A.A., Kireev V.V., Ziyadullaev Sh.H., Muhtorov Sh.M., Alimzhanova L.I. Efficiency of a dense extract of the sum of flavonoids in the form of ointment at treatment contact allergic dermatitis in experiment. *Immunologiya*. 2020; 41 (3): 269–73. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-269-273 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence
Hayrulla M. Khatamov –
PhD, Senior Researcher,
Laboratory of Immunopharmacology,
Institute of Immunology
and Human Genomic of AS RUz,
Tashkent, Uzbek Republic
E-mail: xabas@rambler.ru

Введение

Конец XX и начало XXI в. ознаменовались значительным ростом распространенности аллергической патологии среди взрослого и детского населения во всех странах мира. По последним данным, аллергические заболевания кожи в структуре дерматологической патологии занимают 20–40 %, причем эта цифра неуклонно растет [1, 2]. При лечении аллергического дерматита современная медицина использует большой арсенал синтетических лекарственных средств в виде мазей. Сам подход к расширению спектра лекарственных агентов за счет биологических активных соединений представляется чрезвычайно перспективным [3, 4].

Цель данного исследования – изучение специфической активности препарата наружного действия – густого экстракта суммы флавоноидов из травы череды трехраздельной (лат. *Bidens tripartita*) и ее сравнение с референс-препаратами – антигистаминной мазью Псило-Бальзам® и глюкокортикоидной мазью Целестодерм В®.

Материал и методы

Разработано новое лекарственное средство – густой экстракт суммы флавоноидов в виде мази из череды трехраздельной (лат. *Bidens tripartita*). Был изучен процесс получения гидрофобной основы для мазей с помощью ферментативной переэтерификации растительных масел и животных жиров из местного сырья, а также изучены ее физико-химические свойства.

С использованием суммы флавоноидов череды трехраздельной, растительных масел и животных жиров

биотехнологическим методом была получена новая мазь и разработана технология ее производства в различных процентных соотношениях. В процессе изготовления мазей сумму флавоноидов череды трехраздельной растворяли в 70 % этиловом спирте и добавляли небольшими количествами при постоянном перемешивании в мазевую основу до получения однородной массы. Получены 1, 3 и 5 % мази густого экстракта суммы флавоноидов. Цвет мази был от светло- до темно-серого. Физико-химические свойства готовой мази, а также ее дисперсность, pH, коллоидная стабильность, число кислотности, йодное число и вязкость были определены по требованиям Международной фармакопеи ВОЗ, 4-я редакция (*International pharmacopoeia* vol. 4, 2006). Содержание биологически активных веществ в составе мази определяли спектрофотометрическим методом [5, 6].

Аллергический контактный дерматит (АКД) вызывали двукратной аппликацией 5 % спиртово-ацетонного раствора 2,4-динитрохлорбензола (ДНХБ) на взрослых морских свинках массой 300–400 г по методу Е.Я. Ивлевой и П.М. Залкан (1965) [7]. Животные содержались в стандартных условиях вивария и имели свободный доступ к пище и воде. Все манипуляции проводились согласно Хельсинкской конвенции по защите прав животных. Очаг сенсibilизации создавали на участке спины животных размером 3 × 3 см, с которого предварительно удаляли шерстный покров. На участок кожи наносили ДНХБ в дозе 0,1 мл 5 % спиртово-ацетонного раствора (2 : 1). Животным с АКД через сутки после второй аппликации аллергена наносили мазь густого экстракта суммы флавоноидов.

Данная модель соответствует аллергической реакции, которая развивается по замедленному типу и, в отличие от других типов аллергических реакций, в ней не принимают участие антитела, которые при взаимодействии с антигеном приводят к высвобождению медиаторов воспаления (гистамин, лейкотриены, цитокины и др.).

При АКД ткани повреждаются в результате инфильтрации Т-лимфоцитами и продуктами активированных макрофагов (гидролитические ферменты, провоспалительные цитокины и пр.). ДНХБ – это сильный аллерген, имеющий высокую проникающую способность при нанесении на кожу и провоцирующий у экспериментальных животных развитие выраженной воспалительной реакции аллергического характера, которая по клиническим признакам является аналогом аллергического дерматита у человека.

Для эксперимента использовали 36 морских свинок массой 300–400 г. Экспериментальных животных разделили на 6 групп по 6 животных. Животным каждой группы наносили различные дозы мази: 1-я группа – интактный контроль; 2-я группа – 1 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов; 3-я группа – 3 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов; 4-я группа – 5 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов; 5-я группа – Псило-Бальзам®; 6-я группа – мазь Целестодерм В®. За развитием дерматита наблюдали в динамике на 1, 3, 5, 7, 9 и 11-е сутки эксперимента. Тяжесть воспалительных проявлений кожи оценивали в баллах по И.В. Кутузову (1996): 0 баллов – отсутствие реакции; 0,5 балла – проявление изолированных красных пятен; 1 балл – диффузно-умеренная гиперемия; 2 балл – четкая гиперемия и отечность; 3 балла – резкое покраснение и значительный отек; 4 балла – образование геморрагических корок; 5 баллов – образование обширных язв.

Индекс уменьшения тяжести кожных проявлений (*Ind*) рассчитывали по отношению к контрольной группе животных по формуле в процентах:

$$Ind = 100 (Sk - So) / Sk,$$

где *Sk* – суммы баллов в контрольной группе; *So* – сумма баллов в опытной группе [3, 5].

Одновременно регистрировали кожную температуру морских свинок с аллергическим дерматитом с помощью электронного термометра и величину кожной складки с помощью микрометра. Животным с АКД через сутки после второй аппликации аллергена (на 3-и сутки эксперимента) наносили мазь 1 раз в сутки течение 11 сут.

Характер изменения кожных покровов оценивали на 1, 3, 5, 7, 9 и 11-е сутки после последней аппликации аллергена. О тяжести развития АКД судили по общему состоянию и поведению животных.

1. Тяжесть аллергического процесса (частота реакции воспаления, ее титр и генерализация реакции воспаления у леченных животных в сравнении с соот-

ветствующими показателями у животных контрольной группы).

2. Интенсивность воспалительной реакции (отек, гиперемия, инфильтрация кожи).

3. Оценка тяжести местных кожных проявлений: толщина кожной складки и температура.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования (см. табл.) показали образование на 1-е сутки у животных контрольной группы изолированных красных пятен, а у некоторых – диффузной умеренной гиперемии, оцениваемой в среднем в $0,6 \pm 0,1$ балла. К 3-м суткам эксперимента наблюдали резкое покраснение, значительный отек, образование геморрагической корки, которые оценивали в $4,6 \pm 0,2$ балла. Состояние животных на 5-е сутки было почти таким же, как и на 3-и сутки, и оценивалось в $4,3 \pm 0,3$ балла. Такое состояние держалось до 7, 10 и 13-х суток наблюдения и оценивалось соответственно в $4,4 \pm 0,4$, $4 \pm 0,4$ и $4,0 \pm 0,4$ балла. Общая сумма баллов этой группы составила 21,9 (см. табл.).

В 1-е сутки эксперимента у 2-й группы животных на кожных покровах наблюдали изолированные красные пятна и некоторую диффузную умеренную гиперемию, оцениваемую в $0,6 \pm 0,1$ балла. К 3-м суткам наблюдались резкое покраснение и значительный отек, геморрагические корки и обширные язвы, оцениваемые в $4,2 \pm 0,3$ балла. На 5-е сутки на кожных покровах животных появились резкое покраснение и значительный отек, геморрагические корки и образование обширных язв, оцениваемые в $4,6 \pm 0,3$ балла. К 7-м суткам эксперимента отек остался, покраснение уменьшилось, отпала геморрагическая корка и началось восстановление кожного покрова, которое оценивалось в $4,0 \pm 0,2$ балла. К 9-м суткам наблюдения у животных уменьшились покраснение и отек по сравнению с группой контроля, показатели тяжести воспалительных проявлений оценивались в $2,9 \pm 0,2^*$ балла (снижение по сравнению с показателями в контрольной группе было достоверным). На 11-е сутки эксперимента остались лишь изолированные красные пятна, диффузно-умеренная гиперемия и у некоторых животных – четкая гиперемия и отечность. Оценка тяжести воспалительных проявлений составила $1,9 \pm 0,2^*$ балла, общая сумма баллов составила 18,2 и *Ind* – 16,9 %.

В 1-е сутки эксперимента в 3-й группе животных изменения кожных покровов были такими же, как и в предыдущих группах, и оценивались в $0,6 \pm 0,1$ балла. К 3-м суткам наблюдения возникали резкое покраснение, отек, геморрагические корки, у некоторых животных наблюдались обширные язвы. Степень тяжести кожных проявлений оценивалась в $4,6 \pm 0,3$ балла. На 5-е сутки эксперимента воспалительный процесс начал уменьшаться, степень тяжести кожных проявлений составила $4,0 \pm 0$ балла. К 7-м суткам эксперимента процесс воспаления продолжал достоверно уменьшаться по сравнению с контрольной группой, при этом степень тяжести кожных проявлений составила $3,2 \pm 0,2^*$ балла.

Изменение тяжести кожных процессов в баллах при лечении экспериментального кожного дерматита

Группа (n = б)	Тяжесть кожных процессов в баллах, сут исследования (M ± m)						Сумма баллов	Ind, %
	1	3	5	7	9	11		
1-я (контроль)	0,6 ± 0,1	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4 ± 0,4	4,0 ± 0,4	21,9	
2-я – 1 % мазь суммы флавоноидов	0,6 ± 0,1	4,2 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2*	1,9 ± 0,2*	18,2	16,9
3-я – 3 % мазь суммы флавоноидов	0,6 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,0 ± 0	3,2 ± 0,2*	2,5 ± 0,1*	1,5 ± 0,1*	16,4	25,1
4-я – 5 % мазь суммы флавоноидов	0,6 ± 0,1	4,6 ± 0,3	3,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1*	1,5 ± 0,2*	0,36 ± 0,2*	13,6	37,9
5-я – Псило-Бальзам®	0,7 ± 0,1	4,8 ± 0,2	5 ± 0	4,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2*	2,3 ± 0,2*	20,4	6,84
6-я – мазь Целестодерм В®	0,7 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2*	2,4 ± 0,2*	1,5 ± 0,3*	17,0	22,4

Примечание. Здесь и по всему тексту: * – $p \leq 0,005$ достоверно по сравнению с контрольной группой.

С этого дня эксперимента показатели продолжали достоверно уменьшаться по сравнению с группой контроля соответственно (9-й день – $2,5 \pm 0,1^*$ балла, 11-день – $1,5 \pm 0,1^*$ балла). Общая сумма баллов была равна 16,4, а Ind составил 25,1 %.

У животных 4-й группы в 1-е сутки эксперимента на кожных покровах наблюдались изолированные красные пятна и некоторая диффузная умеренная гиперемия, которая оценивалась в $0,6 \pm 0,1$ балла. К 3-м суткам эксперимента наблюдали отек, геморрагические корки и образование обширных язв, которые оценивали в $4,6 \pm 0,3$ балла. К 5-м суткам исчезли геморрагические корки, остались только гиперемия, отек и резкое покраснение, они оценивались в $3,8 \pm 0,1^*$ балла. С этих суток показатели достоверно уменьшались по сравнению с группой контроля. К 7-м суткам у 1 животного была отмечена умеренная гиперемия, а у 5 – четко выраженные гиперемия и отечность, которые оценивали в $2,8 \pm 0,1^*$ балла. К 9-м суткам у 1 животного не было кожной реакции, у 1 животного наблюдались изолированные красные пятна, а у 4 животных – умеренная гиперемия, оцениваемые в среднем в $1,5 \pm 0,2^*$ балла.

К 11-м суткам эксперимента у 4 животных не обнаруживалось реакции кожных покровов, которые полностью восстановились, у 1 животного наблюдались изолированные красные пятна и у 1 – диффузная гиперемия, степень тяжести кожных проявлений составила $0,36 \pm 0,2^*$ балла. Общая сумма баллов была 13,6, а Ind составил 37,9 %.

В 5-й группе животных в 1-е сутки эксперимента наблюдались изолированные красные пятна и гиперемия, степень тяжести кожных проявлений составила $0,7 \pm 0,1$ балла. На 3-и сутки развилась четкая гиперемия и отечность, резкое покраснение, отек, геморрагические корки и обширные язвы, оцениваемые в $4,8 \pm 0,2$ балла. К 5-м суткам наблюдения у всех животных отмечались отек, геморрагические корки и обширные язвы, оценка которых составила $5,0 \pm 0$ балла. К 7-м суткам начало уменьшаться воспаление кожных покровов, но наблюдались умеренная гиперемия, отек, геморрагические корки и маленькие язвы, степень тяжести кожных проявлений составила $4,4 \pm 0,2$ балла.

К 9-м суткам воспалительный процесс продолжал уменьшаться, но были выявлены резкая гиперемия, отек, геморрагические корки, степень тяжести кожных проявлений составила $3,2 \pm 0,2^*$ балла. С этих суток показатели данной группы продолжали достоверно уменьшаться по сравнению с группой контроля, степень тяжести кожных проявлений составила $2,5 \pm 0,1^*$ балла. К 11-м суткам наблюдения у 2 животных сохранялась диффузная гиперемия, у 2 – четкая гиперемия и отек, у 2 – резкое покраснение и значительный отек, показатели степени тяжести кожных проявлений оценивали в $2,3 \pm 0,2^*$ балла. Общая сумма баллов составила 20,4, а Ind – 6,84 %.

В кожных покровах в 6-й группе животных в 1-е сутки наблюдения, как и в других группах животных, обнаруживались изолированные красные пятна и гиперемия, степень тяжести кожных проявлений была оценена в $0,7 \pm 0,1$ балла. К 3-м суткам выявлялись четкая гиперемия и отечность, резкое покраснение, отек, геморрагические корки и обширные язвы, оцениваемые в $4,7 \pm 0,2$ балла. К 5-м суткам эксперимента состояние было почти аналогичным наблюдаемому на 3-и сутки, сумма баллов составила $4,5 \pm 0,2$. К 7-м суткам воспаление начало уменьшаться, на кожных покровах сохранялись покраснение, отек, геморрагические корки, степень тяжести кожных проявлений составляла $3,2 \pm 0,2^*$ балла. С этих суток в этой группе показатели были достоверно снижены по сравнению с группой контроля. На 9-е сутки наблюдались покраснение, отек продолжал уменьшаться, степень тяжести кожных проявлений была оценена в $2,4 \pm 0,2^*$ балла. На 11-е сутки у 1 животного не обнаружено реакции кожных покровов, у 3 наблюдалась диффузная гиперемия, у 2 – четкая гиперемия и отечность, оцениваемые в $1,5 \pm 0,3^*$ балла. Общая сумма баллов составила 17,0, а Ind – 22,4%.

Как показали результаты экспериментального исследования, на кожных покровах в 1-й группе (группа контроля) в 1-е сутки наблюдались легкие симптомы АКД, к 3-м суткам развилось резкое повреждение кожных покровов, а к 5-м суткам появилось небольшое улучшение, но это состояние сохранялось до конца эксперимента. В 1-е сутки во 2-й группе животных отмечены легкие симптомы АКД, а на 3-и и 5-е сутки эксперимента разви-

валось резкое повреждение кожных покровов, к 7-м суткам наблюдалось небольшое улучшение, только с 9-х суток показатели воспаления начали достоверно уменьшаться по сравнению с контрольной группой, *Ind* был равен 16,9 %. В 1-е сутки в 3-й группе животных, как и в других экспериментальных группах, отмечались легкие симптомы АКД, к 3-м суткам развивались резкие кожные проявления, к 5-м суткам симптомы повреждения уменьшались, а с 7-х суток показатели кожных проявлений стали достоверно улучшаться по сравнению с группой контроля, *Ind* составил 25,1 %. В 4-й группе животных в 1-е сутки выявлены легкие симптомы АКД, с 3-х суток – резкое ухудшение кожных проявлений, а с 5-х суток они стали достоверно уменьшаться, *Ind* составил 37,9 %.

■ Литература

1. Прошутинская Д.В., Чикин В.В., Знаменская Л.Ф., Монахов К.Н., Заславский Д.В., Менева А.А. Федеральные клинические рекомендации по ведению больных atopическим дерматитом. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. Москва, 2015.
2. Kalsy J., Puri K.J. Erythoderma in children: clinico-etiological study from Punja Indian. J. Pediatr. Dermatol. 2013; 14 (1): 9–12.
3. Суяров А.А., Жапаров О.К., Хатамов Х.М., Батырбеков А.А. Перспективы использования «Аллергодаф», полученного из череды трехраздельной, в качестве противоаллергического средства. Методические рекомендации. Ташкент, 2018.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Хабриев Р.У. (ред.). Москва, 2005: 832 с.

■ References

1. Proshutinskaya D.V., Chikin V.V., Znamenskaya L.F., Monakhov K.N., Zaslavskiy D.V., Meneeva A.A. Federal clinical recommendations for the management of patients with atopic dermatitis. Russian Society of Dermatovenerologists and cosmetologists. Moscow, 2015. (in Russian)
2. Kalsy J., Puri K.J. Erythoderma in children: Clinico-etiological study from Punja Indian. J. Pediatr. Dermatol. 2013; 14 (1): 9–12.
3. Suyarov A.A., Zhaparov O.K., Khatamov Kh.M., Bатырбеков А.А. Prospects of using «Allergodaf», obtained from the three-part series, as an anti-allergic agent. Methodical recommendation. Tashkent, 2018. (in Russian)
4. Manual on Experimental (Preclinical). Study of New Pharmacological Substances. In: Khabriev R.U. (ed.). Moscow, 2005: 832 p. (in Russian)

Выводы

Проведенные исследования густого экстракта суммы флавоноидов в виде мази на местной основе позволили сделать следующие выводы.

1. Изученные 1, 3 и 5 % мази густого экстракта суммы флавоноидов для наружного применения основе обладают выраженным действием на экспериментальный контактный дерматит у морских свинок.

2. Наибольшим терапевтическим эффектом обладает 5 % мазь густого экстракта суммы флавоноидов для наружного применения при аллергическом контактном дерматите. При этом индекс уменьшения тяжести кожных проявлений (*Ind*) был наибольшим по сравнению с другими исследуемыми группами – 37,9 %.

5. Филатова А.В., Выпова Н.Л., Джурабаев Д.Т., Зиявудинов Ж.Ф., Тураев А.С. Исследование специфической активности противоаллергенного препарата наружного действия «Флудигель». Фармацевтический журнал Узбекистана. 2016; 2: 40–4.
6. Фозилжоннова М.Ш., Пулатова Ф.О., Тожиева О.Ж., Комилов Х.М. Получение гидрофобной основы для производства мазей из местного сырья. Инфекция, иммунитет и фармакология. 2017; 3: 212–5.
7. Залкан П.М., Иевлиева Е.А. Влияние синтетических моющих веществ на реактивность кожи у морских свинок. В кн.: Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. Москва, 1965: 106–13.

5. Filatova A.V., Vypova N.L., Dzhurabaev D.T., Ziyavutdinov Zh.F., Turaev A.S. The study of the specific activity of anti-allergy drug external action «Fluegel». Farmatsevticheskiy zhurnal Uzbekistana. 2016; 2: 40–4. (in Russian)
6. Fozilzhonova M.Sh., Pulatova F.O., Tozhieva O.Zh., Komilov Kh.M. Getting hidrofob-term framework for the production of ointments from local raw materials. Infektsiya, immunitet i farmakologiya. 2017; 3: 212–5. (in Russian)
7. Zalkan P.M., Ievlieva E.A. Effect of synthetic washing substances on skin reactivity in Guinea pigs. In: Actual Issues of Professional Dermatology. Moscow, 1965: 106–13. (in Russian)

© Шолан Р.Ф., 2020

Шолан Р.Ф.

Особенности иммунопатогенеза интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря

Республиканский лечебно-диагностический центр Министерства здравоохранения Азербайджанской Республики, AZ1122, г. Баку, Азербайджан

Резюме

Введение. Современные исследования подтверждают, что тучные клетки играют центральную роль в патогенезе и патофизиологии интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП). Знания о патофизиологии ИЦ/СБМП необходимы, поскольку они могут помочь в диагностике этой патологии.

Цель исследования – определение экспрессии цитокинов и содержания тучных клеток в слизистой мочевого пузыря, а также их взаимосвязи у пациентов с ИЦ/СБМП.

Материал и методы. Обследованы 126 женщин с клинически диагностированным ИЦ/СБМП, средний возраст – $46,7 \pm 14,0$ года. Концентрацию интерлейкинов (ИЛ)-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли α (ФНО α) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Тучные клетки идентифицированы в биоптатах слизистой мочевого пузыря, взятых в процессе цистоскопии, с помощью гистологического анализа. Статистический анализ выполнен с использованием программы Statistica в Microsoft Excel release 6 (StatSoft, USA). Рассчитан коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты. В основной группе в 56,3 % случаев отмечалась умеренная боль, в 59,5 % случаев – мочеиспускание более 8 раз в сутки. Средний уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α в сыворотке крови обследованных основной группы был выше, чем в группе сравнения на 63,34, 66,67, 68,83 и 70,16 % соответственно. Количество тучных клеток в среднем составило $82,27 \pm 38,76$. Наблюдалась умеренная отрицательная корреляция содержания тучных клеток и уровня ФНО α ($r = -0,418$), значимой корреляции с уровнями ИЛ-6 и ИЛ-8 не выявлено.

Заключение. Идентификация цитокинов у пациентов с ИЦ/СБМП может быть использована для улучшения диагностики и критерия исключения при этой патологии. Анализ сывороточных цитокинов и тучных клеток является удобным подходом к мониторингу активации воспалительных клеток в ткани мочевого пузыря.

Ключевые слова: интерстициальный цистит/синдром болезненного мочевого пузыря; цитокины; тучные клетки; биоптат; корреляция

Статья поступила 04.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Шолан Р.Ф. Особенности иммунопатогенеза интерстициального цистита/синдрома болезненного мочевого пузыря. Иммунология. 2020; 41 (3): 274–279. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-274-279

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Шолан Рашад Фархад оглы –
кандидат медицинских наук,
заведующий отделением
«Почечные болезни
и трансплантология»
Республиканского
лечебно-диагностического центра,
Баку, Азербайджанская Республика
E-mail: ittihaf@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-1047-167X>

Sholan R.F.

Peculiarities of immunopathogenesis of interstitial cystitis/syndrome of a pained bladder

Republican Medical Diagnostic Center of the Ministry of Health of the Republic of Azerbaijan, AZ1122, Baku, Azerbaijan

Abstract

Background. Current research data confirm that mast cells play a central role in the pathogenesis and pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS). Know-

ledge of the pathophysiology of IC/BPS is necessary because it can help in the diagnosis of this pathology.

The aim of the study was to determine the expression of cytokines, mast cells quantity in the bladder mucosa and their relationship in patients with IC/BPS.

Material and methods. A total of 126 women with clinically diagnosed IC/BPS were examined, mean age 46.7 ± 14.0 years. The concentration of interleukins (IL)-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNF α) in blood serum was determined by ELISA. Mast cells were identified in biopsy specimens of the bladder mucosa taken during cystoscopy using histological analysis. Statistical analysis was performed using the Statistica program in Microsoft Excel release 6 (StatSoft, USA). The Pearson correlation coefficient is calculated.

Result. In the main group, moderate pain was observed in 56.3 % of cases, and urination more than 8 times a day in 59.5 % of cases. The average level of pro-inflammatory cytokines – IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α in the blood serum of the examined main group was higher than in the comparison group by 63.34, 66.67, 68.83 and 70.16 % respectively. The number of mast cells averaged 82.27 ± 38.76 . Mast cells number correlated with IL-6 and IL-8 weak, with TNF α – a noticeable relationship ($r = -0,418$). There was a moderate negative correlation between the mast cells number and the level of TNF α ($r = -0.418$), no significant correlation with the levels of IL-6 and IL-8 was found.

Conclusion. The identification of cytokines in patients with IC/BPS can be used to improve the diagnosis and exclusion criteria for this pathology. Analysis of serum cytokines and mast cells is a convenient approach to monitoring the activation of inflammatory cells in the tissue of the bladder.

Keywords: interstitial cystitis/bladder pain syndrome; cytokines; mast cells; biopsy; correlation

Received 04.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Sholan R.F. Peculiarities of immunopathogenesis of interstitial cystitis/syndrome of a painful bladder. Immunologiya. 2019; 41 (3): 274–9. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-274-279 (in Russian)

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The author declare no conflict of interests.

For correspondence

Rashad F. Sholan –
PhD,

Head of Department
of Kidney Diseases
and Transplantology,
Republican Centre

of Diagnosis and Treatment,
Azerbaijan Ministry
of Health, Baku, Azerbaijan

E-mail: ittihaf@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-1047-167X>

Введение

Интерстициальный цистит/синдром болезненного мочевого пузыря (ИЦ/СБМП) является гетерогенным синдромом. Современные патофизиологические концепции сосредоточены на роли иммунной системы в его патогенезе. Свидетельством участия иммунной системы в ИЦ/СБМП является его высокая совместная встречаемость с известными аутоиммунными заболеваниями, измененными профилями цитокинов и инфильтрацией иммунных клеток у пациентов [1–4]. Аутоиммунитет может развиваться через различные механизмы, обычно связанные с продукцией аутоантител или через потерю толерантности, ведущую к развитию аутореактивных Т- и В-клеток [5]. Сообщается об обнаружении клеток адаптивной иммунной системы, состоящей в основном из В- и Т-лимфоцитов, в очагах поражения при ИЦ типа Ханнера [6]. Представлены данные об увеличении числа тучных клеток в подслизистом и детрузорном слоях стенки мочевого пузыря как при язвенных, так и при неязвенных ИЦ/СБМП. Тучные клетки могут быть активированы провоспалительными цитокинами, нейропептидами, бактериальными или вирусными патогенами и ацетилхолином [7]. При активации они могут продуцировать и высвобождать многочисленные провоспалительные медиаторы, вклю-

чая гистамин, фактор роста эндотелия сосудов, протеазы, интерлейкины (ИЛ)-6 и ИЛ-8 и простагландины [8, 9]. Эти данные свидетельствуют о том, что медиаторы воспаления, выделяемые тучными клетками, могут объяснять некоторые аспекты ИЦ/СБМП, включая боль, протекающий уретерий и неоваскулярное кровоизлияние [10, 11].

В отношении роли цитокинов в развитии ИЦ/СБМП нет ясности из-за сложной природы передачи сигналов цитокинами. Несколько цитокинов могут иметь перекрывающиеся функции и биологические эффекты, а один и тот же цитокин может вызывать множественные нисходящие ответы. Профили цитокинов у пациентов с ИЦ/СБМП могут быть использованы для идентификации типов клеток, участвующих в патогенезе заболевания [4, 7]. Исследования, изучающие экспрессию цитокинов с использованием модели цистита, выявили повышенные уровни ИЛ-1, ИЛ-4 и ИЛ-6 в моче и ткани мочевого пузыря [12].

Таким образом, современные данные клинических и лабораторных исследований подтверждают, что тучные клетки играют центральную роль в патогенезе и патофизиологии ИЦ/СБМП. В то же время не исключается, что тучные клетки могут играть гораздо большую роль в развитии ИЦ/СБМП, чем считалось

ранее. Знания о патофизиологии ИЦ/СБМП необходимы, поскольку они могут помочь в диагностике этой патологии.

Цель исследования – определение экспрессии цитокинов и содержания тучных клеток в слизистой мочевого пузыря, а также взаимосвязи этих показателей у пациентов с ИЦ/СБМП.

Материал и методы

Пациенты. Исследование проведено в Республиканском лечебно-диагностическом центре Министерства здравоохранения Азербайджанской Республики в 2016–2018 гг. При исследовании авторы руководствовались принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» [13]. У каждого пациента основной группы и группы сравнения получено информированное согласие.

В исследовании приняли участие 126 женщин с клинически диагностированным ИЦ/СБМП. Диагноз ИЦ/СБМП поставлен с учетом критерия NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease) [14]. *Критериями включения* в исследование были неязвенный тип ИЦ/СБМП, отсутствие сахарного диабета, артрита, системной красной волчанки. *Критериями исключения* – наличие нейрогенного поражения, инфекции мочевыводящих путей. В группе сравнения обследованные не имели в анамнезе ИЦ/СБМП и болезни нижних мочевых путей.

Возраст пациентов варьировал в диапазоне от 22 до 76 лет и составил в среднем $46,7 \pm 14,0$ года. При этом 52 (41,3 %) женщины были репродуктивного возраста и 74 (58,7 %) женщины – в предменопаузальном и менопаузальном возрасте. Длительность заболевания в среднем составила $6,0 \pm 2,8$ года.

Группу сравнения составили 20 женщин, возраст которых колебался в интервале 17–53 лет, средний возраст $35,3 \pm 9,7$ года.

Получение биоматериала, определение цитокинов и анализ тучных клеток. Концентрацию ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли α (ФНО α) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) наборами реагентов фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Тучные клетки идентифицированы в биоптатах слизистой мочевого пузыря, взятых в процессе цистоскопии. Цистоскопия с биопсией мочевого пузыря выполнена эндоскопами фирмы Olympus (Япония) с оптикой 30° и 70°. В качестве местной анестезии и для снижения рис-

ка инфекционно-воспалительных осложнений трансуретрально был введен гель, в состав которого входили лидокаин и хлоргексидин, внутримышечно с гемостатической целью введен раствор этамзилата натрия 250 мг. Биоптаты помещали в 10 % раствор буферизованного формалина, после заливки в парафин и получения парафиновых белков с помощью микротомы готовили срезы толщиной 4 мкм. Для выявления тучных клеток образцы окрашивали толуидиновым синим. Для просмотра микропрепаратов использовали световой микроскоп Olympus Vx 50 и систему камер Olympus PM10SP. Каждое поперечное сечение было разделено на 10 участков, в каждом из них оценивали содержание тучных клеток с помощью следующей шкалы: 0 – нет тучных клеток; 1 – менее 20 тучных клеток; 2 – 20–45 тучных клеток; 3 – более 45 тучных клеток. Баллы всех 10 срезов складывали, делили на 30 (максимально возможный балл) и умножали на 100. Тучные клетки подсчитывали при оптическом увеличении $\times 200$ [15].

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программного обеспечения Statistica в Microsoft Excel release 6 (StatSoft, США). Показатели были выражены в виде среднего значения (M) \pm стандартное отклонение (SD), а также в виде чисел и процентов. Рассчитан коэффициент корреляции Пирсона и уровень значимости. Статистические оценки считались значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты

У большинства женщин с ИЦ/СБМП основной группы отмечались умеренная боль (56,3 %) и мочеиспускание более 8 раз в сутки (59,5 %). Емкость мочевого пузыря в среднем составила $276,0 \pm 61,8$ мл. У женщин с ИЦ/СБМП в 43,6 % случаев встречались диффузные подслизистые кровоизлияния.

Показано статистически значимое повышение содержания цитокинов и тучных клеток в крови пациентов с ИЦ/СБМП по отношению к соответствующим показателям в группе сравнения (табл. 1).

Как следует из табл. 1, средний уровень провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α в сыворотке крови обследованных основной группы был выше, чем в группе сравнения на 63,34, 66,67, 68,83 и 70,16 % соответственно. Подсчет тучных клеток в образцах показал колебание количества этих клеток от 0 до 237, что в среднем составило $82,27 \pm 38,76$.

Уровни ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 в сыворотке крови обследованных пациентов с ИЦ/СБМП не коррелировали с содержанием тучных клеток в образцах биопсии. Наблюдалась умеренная отрицательная корреляция уров-

Таблица 1. Уровень цитокинов в крови пациентов

Показатель, пг/мл	Основная группа (n = 126)	Группа сравнения (n = 20)	p
ИЛ-1 β	$5,21 \pm 1,28$ (1,27–10,33)	$1,91 \pm 0,53$ (1,04–3,78)	$< 0,01$
ИЛ-6	$3,03 \pm 0,45$ (0,28–5,80)	$1,01 \pm 0,29$ (0,22–3,58)	$< 0,01$
ИЛ-8	$4,46 \pm 0,80$ (0,17–11,43)	$1,39 \pm 0,64$ (0,12–4,0)	$< 0,01$
ФНО α	$3,72 \pm 1,21$ (0,73–14,10)	$1,11 \pm 0,33$ (0,14–5,16)	$< 0,01$

ней ФНО α в сыворотке крови с содержанием тучных клетках в образцах биопсии обследованных пациентов (табл. 2, рисунок).

Обсуждение

Как уже отмечалось, этиология ИЦ/СБМП до конца не изучена, но в качестве потенциальной причины патогенеза заболевания предполагается воспаление мочевого пузыря, связанное с продукцией воспалительных цитокинов [16, 17]. Мы исследовали содержание 4 цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α) в крови пациентов с ИЦ/СБМП и выявили статистически значимое повышение уровней этих провоспалительных цитокинов. Полученные данные сопоставимы с результатами А.Т. Согорап и соавт. [16]. Повышенные уровни цитокинов, в частности ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО α , у пациентов с ИЦ/СБМП также отмечают и другие исследователи [18–21]. L.M. Lamale и соавт. [22] предложили использовать комбинацию метилгистамина и ИЛ-6 в качестве чувствительного и специфического маркера для ИЦ/СБМП. Установлено, что повышение уровня этих медиаторов в крови или в биологических жидкостях является маркером воспалительного процесса. Согласно нашим результатам, в крови пациентов с ИЦ/СБМП наблюдались сравнительно высокие уровни ИЛ-8 и ФНО α . Нужно отметить, что ИЛ-8, который секретируется клетками мочевого пузыря и почек, играет важную роль в активации миграции нейтрофилов при внедрении уропатогенов, а ФНО α представляет собой многофункциональный цитокин со множеством провоспалительных и иммунорегуляторных активностей.

Известно, что цитокины играют решающую роль в патогенезе ряда хронических воспалительных заболеваний, их общей функцией является активация воспалительной клеточной адгезии и инфильтрации лейкоцитов в очаги воспаления. Помимо этого, предполагается, что ключевую роль в развитии воспаления и индукции боли при ИЦ/СБМП играют также тучные клетки [16, 23–25]. Следует отметить, что тучные клетки – это многофункциональные иммунные клетки, которые развиваются от предшественника в костном мозге, мигрируют в периваскулярные пространства ткани и приобретают различные характеристики в результате условий микроокружения. Они встречаются в различном количестве практически во всех тканях, участвуют в первой линии защиты от бактериальных и вирусных антигенов, попадающих в организм, из-за их расположения в коже и в слизистой оболочке [26].

Тучные клетки участвуют в целом ряде патофизиологических процессов. Они продуцируют широкий спектр медиаторов воспаления и других физиологически активных веществ. В частности, активированные тучные клетки могут продуцировать цитокины – ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и др. [26]. Тучные клетки взаимодействуют со многими иммунными и неиммунными клетками, они участвуют в защитных реакциях, способны быстро

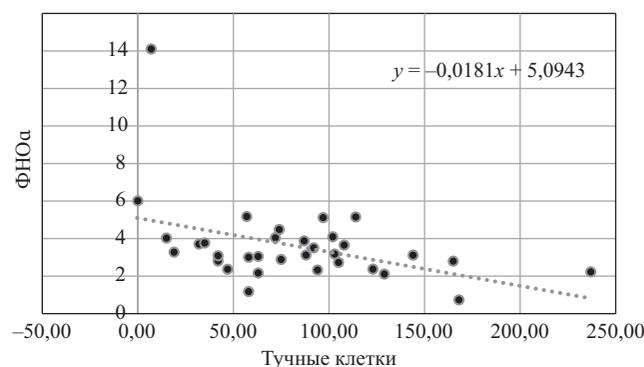
Таблица 2. Коэффициент корреляции между количеством тучных клеток и уровнем цитокинов

Показатель	Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости
ИЛ-1 β	0	–
ИЛ-6	-0,024	0,1
ИЛ-8	-0,109	0,1
ФНО- α	-0,418	0,02

реагировать на метаболические и иммунные изменения в их микроокружении.

В нескольких сообщениях указывалось, что в образцах ткани мочевого пузыря пациентов с ИЦ/СБМП обнаружено увеличение количества инфильтрированных тучных клеток, причем они обнаруживаются как в эпителии, так и при промывании мочевого пузыря пациентов с ИЦ/СБМП, но не у здоровых индивидумов [20, 27–29]. Эти данные позволяют предположить, что заболевание опосредовано иммунной системой и аномалии могут быть вызваны нарушением регуляции воспалительного ответа. При ИЦ/СБМП увеличивается число тучных клеток в мочевом пузыре, и они в основном активируются, поскольку частично или полностью дегранулированы. Таким образом, увеличение количества тучных клеток и их активация в слизистой оболочке мочевого пузыря позволяет предположить, что тучные клетки являются одним из основных факторов, связанных с этиологией данного заболевания.

Тучная клетка является иммунной клеткой, известной своими функциями в защитных реакциях. Их инфильтрация в ткань мочевого пузыря при ИЦ/СБМП была тщательно изучена. Хотя многие исследователи отмечают увеличение плотности тучных клеток, тем не менее встречаются и противоположные сообщения. Так, Y. Akiyama и соавт. [30] при ИЦ/СБМП отмечают, что плотность тучных клеток существенно не различается между образцами ИЦ/СБМП и контрольными образцами без него с аналогичной степенью фонового



Корреляционная связь между количеством тучных клеток в образцах биопсии и уровнем ФНО α в сыворотке крови пациентов с ИЦ/СБМП

воспаления. Авторы считают, что количество тучных клеток не имеет значимости в дифференциальной диагностике ИЦ/СБМП.

Способность тучных клеток к продукции цитокинов позволяет рассматривать их не только как провоспалительные эффекторные клетки, но и как регуляторные компоненты иммунной системы. Анализ корреляции количества тучных клеток с уровнем провоспалительных цитокинов в крови пациентов с ИЦ/СБМП не выявил сильных связей. В образцах биопсии слизистой мочевого пузыря обнаружена слабая корреляция количества тучных клеток с уровнем ИЛ-8 и умеренная отрицательная корреляция – с уровнем ФНО α , что указывало

на непропорциональную дегрануляцию тучных клеток в ответ на повышенную концентрацию цитокинов в крови. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об участии цитокинов и тучных клеток в патогенезе ИЦ/СБМП.

Заключение

Идентификация цитокинов у пациентов с ИЦ/СБМП может быть использована для улучшения диагностики и критерия исключения при этой патологии. Анализ уровня сывороточных цитокинов и количества тучных клеток является удобным подходом к мониторингу активности воспалительных клеток в ткани мочевого пузыря.

Литература

- Keller J.J., Chen Y.K., Lin H.C. Comorbidities of bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a population-based study. *BJU Int.* 2012; 110 (11 Pt C): E903–9. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11539.x.
- Слесаревская М.Н., Игнашов Ю.А., Кузьмин И.В. Современные подходы к диагностике синдрома болезненного мочевого пузыря. *Урологические ведомости.* 2017; 7 (2): 25–3. DOI: 10.17816/uroved7225-30.
- Ke Q.-S., Kuo H.-C. Pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Tzu Chi Med. J.* 2015; 27 (4): 139–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2015.09.006>.
- Duh K., Funaro M.G., DeGouveia W., Bahlani S., Pappas D., Najjar S. et al. Crosstalk between the immune system and neural pathways in interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Discov. Med.* 2018; 25 (139): 243–50.
- Wang L., Wang F.S., Gershwin M.E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.* 2015; 278 (4): 369–95. DOI: 10.1111/joim.12395.
- Akiyama Y., Morikawa T., Maeda D., Shintani Y., Niimi A., Nomiya A. et al. Increased CXCR3 expression of infiltrating plasma cells in Hunner type interstitial cystitis. *Sci. Rep.* 2016; 24 (6): 28652. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28652>.
- Grover S., Srivastava A., Lee R., Tewari A.K., Te A.E. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther. Adv. Urol.* 2011; 3 (1): 19–33. URL: <http://dx.doi.org/10.1177/1756287211398255>.
- Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Varvara G., Murmura G., Saggini A., Potalivo G., Caraffa A. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2013; 26 (2): 327–35. DOI: 10.1177/039463201302600206.
- Jiang Y.-H., Peng C.-H., Liu H.-T., Kuo H.-C. Increased pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and nerve growth factor expressions in serum of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e76779. DOI: 10.1371/journal.pone.0076779.
- Peters K.M., Diokno A.C., Steinert B.W. Preliminary study on urinary cytokine levels in interstitial cystitis: does intravesical Bacille Calmette-Guerin treat interstitial cystitis by altering the immune profile in the bladder? *Urology.* 1999; 54 (3): 450–3.
- Peng C.H., Jhang J.F., Shie J.H., Kuo H.C. Down regulation of vascular endothelial growth factor is associated with decreased inflammation after intravesical Onabotulinum toxin A injections combined with hydrodistention for patients with interstitial cystitis – clinical results and immunohistochemistry analysis. *Urology.* 2013; 82 (6): 1452.e1–6. DOI: 10.1016/j.urology.2013.09.003.
- Smaldone M.C., Vodovotz Y., Tyagi V., Barclay D., Philips B.J., Yoshimura N. et al. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Urology.* 2009; 73 (2): 421–6. DOI: 10.1016/j.urology.2008.07.031.
- World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013; 310 (20): 2191–4.
- Gillenwater J.Y., Wein A.J. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases. Workshop on Interstitial Cystitis. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28–29, 1987. *J. Urol.* 1988; 140: 203–6. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)41529-1.
- Bayrak O., Seckiner I., Solakhan M., Karakok M., Erturhan S.M., Yagci F. Effects of intravesical dexamethasone on lipid peroxidation and bladder histology in a chemical cystitis animal model. *Urology.* 2012; 79: 1023–6. DOI: 10.1016/j.urology.2012.01.025.
- Corcoran A.T., Yoshimura N., Tyagi V., Jacobs B., Leng W., Tyagi P. Mapping the cytokine profile of painful bladder syndrome/interstitial cystitis in human bladder and urine specimens. *World J. Urol.* 2012; 31 (1): 241–6. DOI: 10.1007/s00345-012-0852-y.
- Миркин Я.Б., Карапетян А.В. Интерстициальный цистит: патогенез, диагностика и лечение (часть 2). *Экспериментальная и клиническая урология.* 2018; 2: 118–22.
- Mishra N.N. Clinical presentation and treatment of bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC) in India. *Transl. Androl. Urol.* 2015; 4 (5): 512–23. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.10.05.
- Jhang J.-F., Kuo H.-C. Pathomechanism of interstitial cystitis/bladder pain syndrome and mapping the heterogeneity of disease. *Int. Neurourol. J.* 2016; 20 (2): S95–104. DOI: 10.5213/inj.1632712.356.
- Liu H.T., Kuo H.C. Biomarkers for patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urol. Sci.* 2015; 26: 225–9. URL: <https://doi.org/10.1016/j.urols.2015.02.002>.
- Gamper M., Viereck V., Eberhard J., Binder J., Moll C., Welter J., Moser R. Local immune response in bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C. *Int. Urogynecol. J.* 2013; 24 (12): 2049–57. DOI: 10.1007/s00192-013-2112-0.
- Lamale L.M., Lutgendorf S.K., Zimmerman M.B., Kreder K.J. Interleukin-6, histamine, and methylhistamine as diagnostic markers for interstitial cystitis. *Urology.* 2006; 68 (4): 702–6. URL: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.04.033>.
- Gonzalez E.J., Arms L., Vizzard M.A. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 120525. DOI: 10.1155/2014/120525.
- Ogawa T., Homma T., Igawa Y., Seki S., Ishizuka O., Imamura T. et al. CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. *J. Urol.* 2010; 183 (3): 1206–12. DOI: 10.1016/j.juro.2009.11.007.
- Ratner V. The importance of mast cells in interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Transl. Androl. Urol.* 2016; 5 (3): 398. DOI: 10.21037/tau.2016.03.19.
- Haidl I.D., Marshall J.S. Human mast cell activation with viruses and pathogen products. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1220: 179–201. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_12.
- Aldenborg F., Fall M., Enerback L. Proliferation and transepithelial migration of mucosal mast cells in interstitial cystitis. *Immunology.* 1986; 58 (3): 411–6.
- Cardamone C., Parente R., Feo G.D., Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol. Lett.* 2016; 178: 10–4. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.07.003.
- Gamper M., Regauer S., Welter J., Eberhard J., Viereck V. Are mast cells still good biomarkers for bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *J. Urol.* 2015; 193 (6): 1994–2000. DOI: 10.1016/j.juro.2015.01.036.
- Akiyama Y., Maeda D., Morikawa T., Niimi A., Nomiya A., Yamada Y. et al. Digital quantitative analysis of mast cell infiltration in interstitial cystitis. *Neurourol. Urodyn.* 2018; 37 (2): 650–7. URL: <https://doi.org/10.1002/nau.23365>.

■ References

- Keller J.J., Chen Y.K., Lin H.C. Comorbidities of bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a population-based study. *BJU Int.* 2012; 110 (11 Pt C): E903–9. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11539.x.
- Slesarevskaya M.N., Ignashov Yu.A., Kuz'min I.V. Modern approaches to the diagnosis of painful bladder syndrome. *Urologicheskie vedomosti.* 2017; 7 (2): 25–3. DOI: 10.17816/uroved7225-30. (in Russian)
- Ke Q.-S., Kuo H.-C. Pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Tzu Chi Med. J.* 2015; 27 (4): 139–44. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2015.09.006>.
- Duh K., Fusaro M.G., DeGouveia W., Bahlani S., Pappas D., Najjar S., et al. Crosstalk between the immune system and neural pathways in interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Discov. Med.* 2018; 25 (139): 243–50.
- Wang L., Wang F.S., Gershwin M.E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.* 2015; 278 (4): 369–95. DOI: 10.1111/joim.12395.
- Akiyama Y., Morikawa T., Maeda D., Shintani Y., Niimi A., Nomiya A., et al. Increased CXCR3 expression of infiltrating plasma cells in Hunner type interstitial cystitis. *Sci. Rep.* 2016; 24 (6): 28652. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28652>.
- Grover S., Srivastava A., Lee R., Tewari A.K., Te A.E. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther. Adv. Urol.* 2011; 3 (1): 19–33. URL: <http://dx.doi.org/10.1177/1756287211398255>.
- Shaik-Dasthagirisahab Y.B., Varvara G., Murmura G., Saggini A., Potalivo G., Caraffa A., et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2013; 26 (2): 327–35. DOI: 10.1177/039463201302600206.
- Jiang Y.-H., Peng C.-H., Liu H.-T., Kuo H.-C. Increased pro-inflammatory cytokines, C-reactive protein and nerve growth factor expressions in serum of patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *PLoS One.* 2013; 8 (10): e76779. DOI: 10.1371/journal.pone.0076779.
- Peters K.M., Diokno A.C., Steinert B.W. Preliminary study on urinary cytokine levels in interstitial cystitis: does intravesical Bacille Calmette-Guerin treat interstitial cystitis by altering the immune profile in the bladder? *Urology.* 1999; 54 (3): 450–3.
- Peng C.H., Jhang J.F., Shie J.H., Kuo H.C. Down regulation of vascular endothelial growth factor is associated with decreased inflammation after intravesical Onabotulinum toxin A injections combined with hydrodistention for patients with interstitial cystitis – clinical results and immunohistochemistry analysis. *Urology.* 2013; 82 (6): 1452.e1–6. DOI: 10.1016/j.urology.2013.09.003.
- Smaldone M.C., Vodovotz Y., Tyagi V., Barclay D., Philips B.J., Yoshimura N., et al. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Urology.* 2009; 73 (2): 421–6. DOI: 10.1016/j.urology.2008.07.031.
- World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013; 310 (20): 2191–4.
- Gillenwater J.Y., Wein A.J. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes and Kidney Diseases. Workshop on Interstitial Cystitis. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28–29, 1987. *J. Urol.* 1988; 140: 203–6. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)41529-1.
- Bayrak O., Seckiner I., Solakhan M., Karakok M., Erturhan S.M., Yagci F. Effects of intravesical dexamethasone on lipid peroxidation and bladder histology in a chemical cystitis animal model. *Urology.* 2012; 79: 1023–6. DOI: 10.1016/j.urology.2012.01.025.
- Corcoran A.T., Yoshimura N., Tyagi V., Jacobs B., Leng W., Tyagi P. Mapping the cytokine profile of painful bladder syndrome/interstitial cystitis in human bladder and urine specimens. *World J. Urol.* 2012; 31 (1): 241–6. DOI: 10.1007/s00345-012-0852-y.
- Mirkin Ya.B., Karapetyan A.V. Interstitial cystitis: pathogenesis, diagnosis and treatment (part 2). *Ekspieriment'naya i klinicheskaya urologiya.* 2018; 2: 118–22. (in Russian)
- Mishra N.N. Clinical presentation and treatment of bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC) in India. *Transl. Androl. Urol.* 2015; 4 (5): 512–23. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2015.10.05.
- Jhang J.-F., Kuo H.-C. Pathomechanism of interstitial cystitis/bladder pain syndrome and mapping the heterogeneity of disease. *Int. Neurourol. J.* 2016; 20 (2): S95–104. DOI: 10.5213/inj.1632712.356.
- Liu H.T., Kuo H.C. Biomarkers for patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urol. Sci.* 2015; 26: 225–9. URL: <https://doi.org/10.1016/j.urols.2015.02.002>.
- Gamper M., Viereck V., Eberhard J., Binder J., Moll C., Welter J., Moser R. Local immune response in bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C. *Int. Urogynecol. J.* 2013; 24 (12): 2049–57. DOI: 10.1007/s00192-013-2112-0.
- Lamale L.M., Lutgendorf S.K., Zimmerman M.B., Kredder K.J. Interleukin-6, histamine, and methylhistamine as diagnostic markers for interstitial cystitis. *Urology.* 2006; 68 (4): 702–6. URL: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.04.033>.
- Gonzalez E.J., Arms L., Vizzard M.A. The role(s) of cytokines/chemokines in urinary bladder inflammation and dysfunction. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 120525. DOI: 10.1155/2014/120525.
- Ogawa T., Homma T., Igawa Y., Seki S., Ishizuka O., Imamura T., et al. CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. *J. Urol.* 2010; 183 (3): 1206–12. DOI: 10.1016/j.juro.2009.11.007.
- Ratner V. The importance of mast cells in interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Transl. Androl. Urol.* 2016; 5 (3): 398. DOI: 10.21037/tau.2016.03.19.
- Haidl I.D., Marshall J.S. Human mast cell activation with viruses and pathogen products. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1220: 179–201. URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1568-2_12.
- Aldenberg F., Fall M., Enerbäck L. Proliferation and transepithelial migration of mucosal mast cells in interstitial cystitis. *Immunology.* 1986; 58 (3): 411–6.
- Cardamone C., Parente R., Feo G.D., Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol. Lett.* 2016; 178: 10–4. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.07.003.
- Gamper M., Regauer S., Welter J., Eberhard J., Viereck V. Are mast cells still good biomarkers for bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *J. Urol.* 2015; 193 (6): 1994–2000. DOI: 10.1016/j.juro.2015.01.036.
- Akiyama Y., Maeda D., Morikawa T., Niimi A., Nomiya A., Yamada Y., et al. Digital quantitative analysis of mast cell infiltration in interstitial cystitis. *Neurourol. Urodyn.* 2018; 37 (2): 650–7. URL: <https://doi.org/10.1002/nau.23365>.

Валентина Борисовна ГЕРВАЗИЕВА (1939–2020)



**18 мая 2020 г. ушла из жизни
Валентина Борисовна Гервазиева,
доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации,
замечательный Ученый и Учитель,
человек с неукротимой жаждой познания нового,
широким научным кругозором и неиссякаемой творческой активностью.**

В 1962 г. Валентина Борисовна окончила лечебный факультет Черновицкого медицинского института, где получила фундаментальные знания. Свой путь в науке Валентина Борисовна начинала в аллергологической лаборатории АМН СССР под руководством основоположника отечественной аллергологии А.Д. Адо. Андрей Дмитриевич оставался примером и Учителем, которого Валентина Борисовна с благодарностью и теплотой вспоминала всю свою жизнь.

В 1968 г. Валентина Борисовна защитила кандидатскую диссертацию, в 1984 г. – докторскую. В НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Валентина Борисовна проработала более 50 лет. В 1989 г. она создала и возглавила лабораторию аллергодиагностики, оставаясь ее бессменным руководителем.

Валентина Борисовна была ведущим специалистом в области аллергологии и иммунологии, в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова она возглавляла научное направление, связанное с изучением факторов внешней среды, способствующих формированию аллергического фенотипа у детей, и созданием технологии получения новых диагностических тест-систем и аллергенных препаратов. Под руководством Валентины Борисовны созданы иммуоферментные системы для диагностики аллергии,

аутоиммунитета и оценки эффективности иммунотерапии у больных с аллергическими заболеваниями.

Валентина Борисовна является автором более 300 научных работ, опубликованных в ведущих отечественных и зарубежных изданиях. Она создала научную школу аллергологов, работающих в различных регионах России и за рубежом. Под ее руководством успешно защищено более 30 докторских и кандидатских диссертаций.

За вклад в развитие медицинской науки и практику здравоохранения Валентина Борисовна награждена знаком «Отличник здравоохранения», медалями «Ветеран труда», «В память 850-летия Москвы», почетной грамотой Российской академии медицинских наук. За многолетнюю плодотворную деятельность В.Б. Гервазиева награждена памятными медалями И.И. Мечникова в честь 90-летия и 100-летия НИИВС им. И.И. Мечникова.

Валентина Борисовна обладала уникальной эрудицией, глубокими знаниями, профессиональной, научной интуицией – все свои таланты она реализовала в полной мере. Но ей было дано то, что дается немногим, – быть примером, Учителем, но главное – оставить глубочайший след в сердцах учеников, и всех, кто с ней соприкасался, обращался за помощью и советом.

Коллеги